

FR 00/1744
4

REC'D 02 AUG 2000	
WIPO	PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 2 MAI 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Planche', enclosed within a large, loopy oval stroke.

Martine PLANCHE





BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

cerfa
N° 55-1328

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **22 JUIN 1999**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9907957**
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75 INPI PARIS**
DATE DE DÉPÔT **22 JUIN 1999**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

AVENTIS PHARMA SA
Direction Brevets **TRI LEA 144**
20 avenue Raymond Aron
92165 ANTONY CEDEX

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande
de brevet européen

☒ demande initiale
☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone
07/08/1997 ST99021 0155717692

☐ certificat d'utilité n° date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance ☐ oui ☒ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

**SYSTEME DE REGULATION PHARMACOLOGIQUE DE L'EXPRESSION UTILISANT LES
RECEPTEURS NUCLEAIRES PPAR ET LEURS LIGANDS.**

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN **3 0 4 4 6 3 2 8 4** code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

AVENTIS PHARMA SA

Forme juridique

S.A.

Nationalité (s) **Française**

Adresse (s) complète (s)

**20 avenue Raymond Aron
92160 ANTONY**

Pays

FRANCE

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois ☒ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande
RHONE-POULENC ROGER S.A.

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

BREVET D'INVENTION



BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

X

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9907557

ST99021

TITRE DE L'INVENTION :

SYSTEME DE REGULATION PHARMACOLOGIQUE DE L'EXPRESSION UTILISANT LES RECEPTEURS NUCLEAIRES PPAR ET LEURS LIGANDS.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

RHONE-POULENC RORER S.A.
20 avenue Raymond Aron
92160 ANTONY (FR)

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

DARTEIL Raphael :
1585 Campus Drive - Berkeley CA 94708 (USA)

CROUZET Joël :
12 rue Michel Voisin - 92330 SCEAUX (FRANCE)

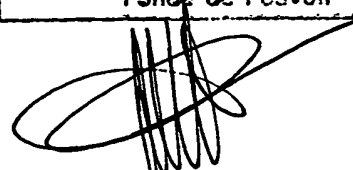
STAELS Bart :
155 Ave D'huart - 1950 KRAAINEM (BELGIQUE)

MAHFOUDI Abderrahim :
41 rue des Bergers - 94440 MAROLLES EN BRIE (FRANCE)

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire
Antony, le 21 juin 1999

RHONE-POULENC RORER S.A.
Fondé de Pouvoir


BOUVET Philippe

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDI- CATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
p10, 42				05.01.00	13 JANV 2000-VI
p. 42				14.01.00	21 JANV 2000-VI

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

La présente invention concerne le domaine de la biologie. Elle concerne notamment le domaine de la régulation de l'expression de gènes et, plus particulièrement, elle décrit la mise au point et le développement d'un nouveau système de régulation pharmacologique de l'expression de transgènes. L'invention repose notamment sur l'utilisation de constructions d'origine humaine pour activer la transcription du transgène. L'invention décrit ainsi de nouvelles compositions, constructions et méthodes permettant la régulation efficace de l'expression d'un acide nucléique in vitro, ex vivo ou in vivo, par exemple dans les cellules musculaires. Les applications qui découlent de la présente invention sont nombreuses, dans les domaines expérimentaux, cliniques, thérapeutiques ou diagnostiques, par exemple.

Le contrôle du niveau et de la durée de l'expression des transgènes est nécessaire pour de nombreuses applications. Ainsi, en thérapie génique, le succès de la thérapie peut requérir un dosage spécifique de la protéine synthétisée à partir du transgène. De même, la production de protéines recombinantes in vitro peut être améliorée en utilisant des systèmes d'expression inductibles, permettant par exemple de découpler les phases de croissance et de production. La construction d'animaux transgéniques, l'étude des effets d'un gène ou de la biodisponibilité d'une protéine, etc. sont autant de situations dans lesquelles un contrôle approprié de l'expression génétique peut être mis en œuvre et apporter des améliorations.

Différents régulateurs de transcription artificiels ont été conçus dans l'art antérieur, activés par une molécule xénobiotique qui se lie sur les séquences promotrices de la transcription du transgène.

Une première illustration de ces régulateurs a été construite par fusion du répresseur Lac de E. coli avec le domaine transactivateur de VP16 du virus herpès simplex (HSV). Deux versions de ces régulateurs existent, l'une pouvant être activée par l'isopropyl b-D-thiogalactoside (IPTG) et l'autre inactivée par l'IPTG (Baim S. et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88** (1991) 5072-5076 ; Labow M. et coll., *Mol. Cell. Biol.*, **10** (1990) 3343-3356).

ORIGINAL

Un autre système a été construit par fusion du répresseur Tet de E. coli avec le domaine transactivateur de VP16 de HSV. Il existe également deux versions de ces régulateurs, l'une pouvant être activée par la tétracycline ou ses dérivés et l'autre inactivée par ces mêmes molécules (Gossen M. et Bujard H., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89** (1992) 5547-5551; Gossen M. et coll., *Science*, **268** (1995) 1766-1769).

Un autre système a été construit par fusion du domaine de liaison à l'ADN de la protéine GAL4 de S. cerevisiae avec le domaine de liaison au ligand du récepteur humain à la progestérone et le domaine transactivateur de VP16 de HSV, cette version est activée par un analogue de la progestérone tel que le RU486 (Wang Y. et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91** (1994) 8180-8184). Une fusion du récepteur à l'ecdysone de drosophile avec le domaine transactivateur de VP16 de HSV a également été décrite, activée par l'ecdysone et les analogues de cette hormone stéroïdienne (No D. et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93** (1996) 3346-3351). Un autre système tire parti de la capacité de certaines molécules immunosuppressives (cyclosporine A, rapamycine et ses dérivés) de promouvoir l'association de certaines protéines cellulaires. Un régulateur transcriptionnel est alors constitué de deux sous-unités protéiques, la première peut être formée par la fusion d'un domaine de liaison à l'ADN chimérique et de trois copies de la protéine humaine FKBP et la deuxième par la fusion du domaine de liaison à la rapamycine de la protéine humaine FRAP et du domaine transactivateur de la sous-unité p65 de NFkB humain. Ce régulateur transcriptionnel est activé par la rapamycine qui permet la dimérisation des deux sous-unités (Rivera V. et coll., *Nat. Med.*, **2** (1996) 1028-1032).

Même si ces systèmes permettent d'obtenir des niveaux de régulation satisfaisants dans certains tissus, ils présentent néanmoins certains inconvénients qui limitent leurs conditions d'utilisation. Ainsi, ces régulateurs transcriptionnels sont des protéines xenogéniques chez l'homme. Elles sont en effet constituées de fragments protéiques provenant de bactérie, de virus, de levure ou d'insecte ou, lorsque les domaines protéiques sont d'origine humaine, leur jonction crée des

séquences étrangères à l'homme. Ces domaines protéiques peuvent donc induire une réaction immunitaire cytotoxique, entraînant la destruction des cellules qui expriment le gène d'intérêt sous contrôle du régulateur transcriptionnel xénogénique, et ainsi l'arrêt de l'expression du transgène. Cette situation peut
5 imposer le recours à des administrations répétées du gène thérapeutique, ce qui constitue un inconvénient important, notamment lorsque cela implique un acte chirurgical traumatique, et qui n'est pas toujours efficace, notamment lorsque le vecteur du gène thérapeutique est un virus dont la première injection provoque une réaction immunitaire. En outre, les niveaux d'expression observés avec les
10 systèmes de régulation de l'art antérieur ne sont pas toujours satisfaisants.

Il existe donc un besoin d'un système de régulation de l'expression amélioré, compatible avec un usage in vivo, utilisable dans différents tissus, et assurant des niveaux d'expression importants à l'état activé. La présente invention apporte une solution à ces problèmes.

15 La présente invention concerne en effet un système de régulation utilisant un activateur d'origine humaine. Ceci doit permettre d'éviter les administrations répétées du gène thérapeutique.

La présente invention décrit en particulier un système amélioré d'expression inductible utilisant les récepteurs nucléaires PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptors) comme régulateurs transcriptionnels. L'utilisation de PPRE
20 dans un système d'expression hépatospécifique a été décrit dans la demande WO 98/21349. Le système amélioré selon l'invention permet à présent de produire le régulateur transcriptionnel (une protéine PPAR d'origine humaine, et donc essentiellement non xénogénique chez l'homme). Le promoteur inductible, qui
25 contrôle l'expression du transgène, est composé d'une part d'un promoteur minimum et d'autre part d'un élément de réponse aux PPAR (PPRE). Le système de l'invention est activable, in vitro et également in vivo, en particulier dans le muscle, par les ligands spécifiques des PPAR. De plus, le niveau d'expression du transgène, obtenu après activation, est comparable à celui d'un promoteur fort
30 comme le promoteur hCMV-IE.

Le système selon la présente invention présente donc de nombreux avantages, à la fois en termes d'induction importante, de tolérance (notamment pour un usage in vivo), de force et de conditions d'utilisation.

5 L'invention décrit donc de nouvelles constructions pour la réalisation et la mise en œuvre de ce système, notamment des régions promotrices, des cassettes d'expression et des plasmides. L'invention décrit aussi des constructions nouvelles de PPAR permettant un contrôle amélioré de l'expression de gènes, ainsi que des combinaisons de ces différentes constructions. L'invention montre en outre que
10 ces méthodes et compositions permettent un contrôle et une régulation importants de l'expression in vitro et in vivo. L'invention concerne aussi des cellules comprenant des constructions de l'invention, ainsi que des méthodes de criblage de composés ligands des PPAR, par exemple.

Plus particulièrement, un premier objet de l'invention réside dans une composition comprenant:

15 (a) un premier élément comprenant un acide nucléique d'intérêt sous contrôle d'un promoteur inductible comprenant un élément de réponse à un PPAR et un promoteur transcriptionnel minimal, et

(b) un deuxième élément comprenant un acide nucléique codant un PPAR sous contrôle d'un promoteur transcriptionnel,
20 en vue de leur utilisation simultanée, séparée ou espacée dans le temps.

Dans un mode plus particulier, les compositions de l'invention comprennent en outre:

(c) un ligand de PPAR,
25 également en vue d'une utilisation simultanée, séparée ou espacée dans le temps.

Avantageusement elles comprennent en outre un élément (d) comprenant un acide nucléique codant un récepteur rétinoïde X (RXR) sous contrôle d'un promoteur transcriptionnel.

L'expression en vue d'une utilisation simultanée, séparée ou espacée dans le temps indique que les éléments (a), (b) et, le cas échéant, (c) et/ou (d) peuvent être préparés séparément, conditionnés séparément, et utilisés séquentiellement, pour permettre le contrôle de l'expression de l'acide nucléique d'intérêt. Typiquement, les éléments (a) et (b), et éventuellement (d) sont préparés et conditionnés ensemble, alors que le composé c) est conditionné séparément et utilisé de manière espacée dans le temps avec (a) et (b), et éventuellement (d), la combinaison de ces différents éléments dans une cellule, un tissu, un organe, etc. conduisant à l'effet de régulation d'expression recherché.

A cet égard, dans un mode particulier de réalisation d'une composition de l'invention, les éléments (a), (b) et éventuellement (d) sont portés par des constructions génétiques distinctes.

Dans un autre mode particulier et préféré de réalisation d'une composition de l'invention, les éléments (a), (b) et éventuellement (d) sont assemblés dans une même construction génétique. La présente invention décrit ainsi des constructions génétiques complexes permettant l'expression d'un produit d'intérêt et d'un PPAR. Ces constructions sont particulièrement avantageuses puisqu'elles comportent, à elles seules, l'ensemble des éléments génétiques nécessaires à l'expression régulée de l'acide nucléique d'intérêt.

La ou les constructions génétiques peuvent être de nature et/ou d'origine variées, notamment plasmidique, épisomique, chromosomique, virale, phagique, etc. Préférentiellement, la construction génétique est un vecteur plasmidique ou viral.

A titre illustratif de plasmides portant séparément les éléments (a) ou (b) on peut citer par exemple les plasmides JxnS-TK-pGL3, JxnAS-TK-pGL3, DR1xnS-TK-pGL3, DR1xnAS-TK-pGL3, JxnAS-CMV-pGL3, pSG5-hPPARg2g2, ou Jx10AS-CMV-EF-pGL3, qui seront décrits en détails plus loin.

A titre illustratif de plasmides dans lesquels les éléments (a) et (b) ont été assemblés, on peut citer par exemple les plasmides Jx5AS-TK-Luc-hPPARg2, SV-

g2-J10-C-pGL3, hPPARg2-CMV-Jx5AS-TK-pGL3 ou hPPARg2-CMV-Jx10AS-CMV-pGL3, qui seront décrits en détails plus loin.

Comme exemple de vecteur viral, on peut citer notamment un adénovirus recombinant, un rétrovirus recombinant, un AAV, un herpès virus, un virus de la
5 vaccine, etc., dont la préparation peut être réalisée selon les méthodes connues de l'homme du métier.

L'agencement et la structure des constructions génétiques seront décrits plus en détail dans la suite du texte.

A cet égard, comme indiqué ci-avant, l'élément (a) comprend un promoteur
10 inductible comprenant au moins:

- un élément de réponse à un PPAR, et
- un promoteur transcriptionnel minimal.

Un élément de réponse à un PPAR (PPRE, "Peroxisome Proliferator Response Element") est une région d'acide nucléique capable de fixer un PPAR, la
15 liaison du PPAR pouvant ensuite médier un signal vers des régions nucléiques voisines. Un élément de réponse à un PPAR est donc une région d'acide nucléique capable de lier les PPAR. Pour la mise en œuvre de l'invention, l'élément de réponse à un PPAR comprend plus particulièrement un ou plusieurs sites de liaison du PPAR. De tels sites de liaison ont été décrits dans l'art
20 antérieur, comme par exemple dans différents promoteurs humains (gène de l'apolipoprotéine AII, par exemple). De tels sites peuvent également être construits artificiellement, et testés pour leurs propriétés de PPRE, comme il est décrit ci-après.

Dans un mode particulier de réalisation, l'élément de réponse à un PPAR
25 comprend un ou plusieurs sites de séquence TCAACCTTTACCCTGGTAG (SEQ ID NO:1) ou de variants fonctionnels de cette séquence. La séquence SEQ ID NO:1 correspond à la région J du promoteur de l'apoAII humain (nucléotides -734 à -716).

Dans un autre mode particulier de réalisation, l'élément de réponse à un
30 PPAR comprend un ou plusieurs sites de séquence AGGTCAAAGGTCA (SEQ ID

NO:5) ou de variants fonctionnels de cette séquence. La séquence SEQ ID NO: 5 correspond à la région consensus DR1.

5 Le terme variant fonctionnel désigne toute séquence modifiée conservant les propriétés de PPRE telles que mentionnées ci-dessus, c'est-à-dire notamment la capacité de lier un PPAR. Les modifications peuvent comprendre une ou plusieurs additions, mutations, délétions et/ou substitutions de nucléotides dans la séquence considérée. Ces modifications peuvent être introduites par les méthodes classiques de la biologie moléculaire, telles que notamment la mutagénèse dirigée ou, plus pratiquement, par synthèse artificielle de la séquence dans un synthétiseur. Généralement, les variants conservent au moins 50% des résidus de la séquence initiale indiquée. Plus préférentiellement, les variants possèdent des modifications affectant moins de 5 nucléotides dans la séquence considérée. Les variants ainsi obtenus sont ensuite testés pour leur activité de PPRE. Cette propriété peut être vérifiée de différentes façons, et notamment:

15 (i) par mise en contact de la séquence test avec un PPAR et un récepteur rétinoïde X (RXR), préférentiellement dans un test acellulaire, et détection de la formation d'un complexe (par exemple par retard de migration sur gel);

(ii) par insertion de la séquence test dans une cassette d'expression comprenant un promoteur minimal et un gène reporter, introduction de la cassette dans une cellule, et détection (le cas échéant dosage) de l'expression du gène reporter en présence et en l'absence d'un PPAR et d'un ligand d'un PPAR;

20 (iii) par toute autre technique connue de l'homme du métier, permettant de mettre en évidence l'interaction entre un acide nucléique et une protéine, par exemple.

25 Un variant est considéré comme fonctionnel au sens de la présente invention lorsque l'activité mesurée, par exemple en (ii) ci-dessus, est préférentiellement au moins égale à 50% de celle mesurée avec un site de séquence SEQ ID NO:1 ou 5, plus préférentiellement au moins égale à 75%. Des variants fonctionnels de sites de liaison de PPAR au sens de l'invention sont décrits par exemple dans Juge-

Aubry et al. (J. Biol. Chem. 272 (1997) 25252) et dans Nakshatri et al. (NAR 26 (1998) 2491), incorporés à la présente par référence.

Les récepteurs rétinoïdes X (RXR) sont codés par trois gènes RXR α , RXR β et
5 RXR γ , dont l'isolement et la séquence ont été décrits (Mangelsdorf DJ et al (1990),
Nature **345**, 224-229 ; Mangelsdorf DJ et al (1992), *Genes Dev* **6**, 329-344).
Préférentiellement l'élément (d) code pour le RXR α humain.

En ce qui concerne l'hétérodimérisation PPAR/RXR, deux revues peuvent être
10 consultées : Mangelsdorf DJ and Evans RM (1995), *Cell* **83**, 841-850 et Wilson TM
and Wahli W (1997), *Current Opinion in Chemical Biology* **1**, 235-241. L'article de
Schulman IG et al (1998), *Molecular and Cellular Biology* **18**, 3483-3494 décrit la
transactivation par l'hétérodimère PPAR γ /RXR α .

15 L'utilisation de l'élément (d) est susceptible de synergiser l'activité de l'élément (b).

Comme indiqué ci-avant, dans les compositions selon l'invention, l'élément de
réponse au PPAR peut comprendre plusieurs sites de liaison à un PPAR. Il peut
s'agir d'une répétition d'un même site, ou de combinaisons de sites différents, la
20 répétition de sites identiques étant préférée. Plus particulièrement, l'élément de
réponse comprend jusqu'à 30 sites de liaison, de préférence de 3 à 20, plus
préférentiellement de 5 à 15. Un mode de réalisation préféré de l'invention est une
construction comprenant de 10 à 15 sites de liaison, les résultats présentés dans
les exemples montrent en effet les propriétés avantageuses de telles constructions
25 en termes d'induction et de niveaux d'expression, notamment dans les cellules
musculaires.

Pour la réalisation d'un promoteur inductible selon l'élément (a) des
compositions de l'invention, l'élément de réponse au PPAR est associé à un
promoteur minimal transcriptionnel. Le promoteur minimal est un promoteur
30 transcriptionnel ayant une activité basale faible ou inexistante, et susceptible d'être

augmentée en présence d'un activateur transcriptionnel (l'interaction d'un PPAR activé avec l'élément PPRE). Un promoteur minimal peut donc être un promoteur naturellement faible dans les cellules mammifère, c'est-à-dire produisant une expression non toxique et/ou non suffisante pour obtenir un effet biologique prononcé. Avantageusement, un promoteur minimal est une construction préparée à partir d'un promoteur natif, par délétion de région(s) non essentielle(s) à l'activité transcriptionnelle. Ainsi, il s'agit de préférence d'un promoteur comprenant essentiellement une boîte TATA, généralement d'une taille inférieure à 160 nucléotides, centrée autour du codon d'initiation de la transcription. Un promoteur minimal peut ainsi être préparé à partir de promoteurs viraux, cellulaires, forts ou faibles, tels que par exemple le promoteur du gène de la thymidine kinase (TK) du virus de l'herpès, le promoteur immédiat du CMV, le promoteur PGK, le promoteur du gène de la créatine kinase musculaire (MCK), les promoteurs des gènes des différentes isoformes d'actine du muscle squelettique, le promoteur du gène de la desmine, le promoteur du gène de la vimentine, les promoteurs des gènes de chaîne légère ou chaîne lourde de la myosine, etc. Des exemples particuliers de promoteurs minimum sont représentés par les nucléotides -54 à +48 du CMV ou -105 à +56 du promoteur TK, par exemple. Il est entendu que tout variant de ces promoteurs ou construction similaire à partir d'autres promoteurs peut être construit par l'homme du métier et utilisé dans le cadre de la présente invention.

Le promoteur minimal (Pmin), l'élément de réponse au PPAR (PPRE) et l'acide nucléique d'intérêt (AN) sont agencés de manière fonctionnelle dans l'élément (a), c'est-à-dire de sorte que le promoteur minimal contrôle l'expression de l'acide nucléique d'intérêt et que son activité soit régulée par l'élément PPRE. Généralement, ces régions sont donc disposées dans l'ordre suivant, dans l'orientation 5'→3' : PPRE-Pmin-AN. Toutefois, tout autre agencement fonctionnel peut être envisagé par l'homme du métier sans départir de la présente invention. En outre, les différents domaines fonctionnels ci-dessus peuvent être liés directement les uns aux autres, ou séparés par des nucléotides n'affectant pas significativement le caractère régulé du promoteur de l'élément (a). De tels

nucléotides peuvent être des résidus neutres sur le plan fonctionnel, résultant par exemple d'étapes de clonage (extrémités PCR, sites de restriction, etc.). Ces nucléotides peuvent aussi posséder des propriétés biologiques, permettant de conférer des caractéristiques ou performances améliorées au système de l'invention (enhancer de gènes de ménage, enhancer tissus spécifiques, silenceur, intron, site d'épissage, etc.). A cet égard, dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le promoteur inductible comprend en outre une région enhanceur. Une telle région permet avantageusement d'augmenter les niveaux d'expression de l'acide nucléique d'intérêt. Une telle région enhanceur (E) est préférentiellement positionnée en 3' du promoteur minimal, entre ce dernier et l'acide nucléique d'intérêt, selon le schéma suivant (5'→3'): PPRE-Pmin-E-AN.

D'autre part, dans les constructions de l'invention, le promoteur minimal et l'élément de réponse à un PPAR peuvent être présents soit dans la même orientation (c'est-à-dire dans le sens de la transcription), soit en orientation inverse (c'est-à-dire que l'élément de réponse à un PPAR est dans l'orientation antisens par rapport à la transcription par le promoteur Pmin). Comme illustré dans les exemples, ces deux modes de réalisation permettent un contrôle efficace de la régulation de l'expression in vitro comme in vivo.

Comme indiqué ci-avant, l'élément (b) des compositions selon l'invention comprend au moins:

- un acide nucléique codant un PPAR,
- sous contrôle d'un second promoteur transcriptionnel.

Les PPAR appartiennent à la superfamille des récepteurs hormonaux nucléaires, et sont regroupés dans trois groupes distincts, les PPAR α , PPAR δ (également appelé NUC-1 ou PPAR β) et PPAR γ . L'isolement et la séquence de nombreux PPAR humains ont été décrits dans la littérature (voir notamment Sher T. et coll., *Biochemistry*, **32** (1993) 5598-5604 ; Mukherjee R. et coll., *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **51** (1994) 157-166 ; Fajas L. et coll., *J. Biol. Chem.*, **272** (1997) 18779-18789 ; Mukherjee R. et coll., *J. Biol. Chem.*, **272** (1997) 8071-8076;

Schmidt A. et coll., *Mol. Endocrinol.* **6** (1992) 1634-1641). Le promoteur du PPAR γ a en outre été récemment cloné, comme le décrit la demande WO99/05161.

Dans un mode préféré de l'invention, l'acide nucléique codant un PPAR code un PPAR humain, en particulier un PPAR α ou un PPAR γ . Les résultats présentés dans les exemples montrent en effet que l'utilisation de ces molécules assure au système de l'invention des niveaux de régulation et d'expression importants, notamment dans les cellules musculaires.

Selon un premier mode de mise en œuvre, il s'agit d'un PPAR α ou un PPAR γ dans sa forme native, c'est-à-dire sans modification de structure primaire par rapport à la molécule naturelle.

Selon un autre mode de réalisation, il s'agit d'un PPAR modifié comprenant plusieurs sites de liaison au ligand.

A cet égard, la présente invention décrit et a également pour objet tout PPAR modifié comprenant plusieurs sites de liaison au ligand. Plus particulièrement, il s'agit d'un PPAR α ou un PPAR γ , encore plus préférentiellement d'un PPAR γ . De préférence, les PPAR modifiés selon l'invention comprennent de 2 à 5 sites de liaison au ligand, plus préférentiellement de 2 à 4 sites de liaison. Il s'agit plus particulièrement de PPAR comportant 2 à 5 copies des domaines E et F impliqués dans la liaison au ligand. Les protéines PPAR renferment différents domaines : le domaine N-terminal A/B qui contient une région transactivatrice non dépendante du ligand, le domaine C qui est le domaine de liaison à l'ADN (DBD), le domaine D qui est une région charnière, et les domaines E/F qui contiennent une région transactivatrice dépendante du ligand. Les domaines E/F sont également appelés domaine de liaison du ligand (LBD) (voir notamment Schoonjans K. et coll., *Biochim. Biophys. Acta*, **1302** (1996) 93-109). Les limites des domaines E/F varient d'un PPAR à l'autre. A titre d'exemple, pour l'isoforme PPAR γ 2 humaine utilisée, le domaine E/F s'étend de l'acide aminé 284 à l'acide aminé 505. La présente invention montre maintenant qu'il est possible de construire des PPAR modifiés comprenant plusieurs domaines E et F répétés, et que ces PPAR modifiés sont

fonctionnels et possèdent des propriétés améliorées d'inductibilité par les ligands des PPAR. De telles constructions représentent donc un mode de réalisation et un objet particulier de la présente invention.

Un exemple typique de PPAR modifié selon l'invention est un PPAR_γ2 comportant 2 sites de liaison au ligand (c'est-à-dire deux domaines E et F). La séquence protéique complète de PPAR_γ2 est représentée sur la séquence SEQ ID NO: 24.

SEQ ID N°24

10 MGETLGDSPIDPESDSFTDTLSANISQEMTMVDTEMPFWPTNFGISSVDLSVMEDHSHSFDI
 KPFTTVDFSSISTPHYEDIPFTRTPVVDYKYDLKLQEQSAIKVEPASPPYYSEKTQLYN
 KPHEEPSNSLMAIECRVCGDKASGFHYGVHACEGCKGFFRRTIRLKLIDRCDLNCRIHKKS
 RNKCQYCRFQKCLAVGMSHNAIRFGMPQAEKEKLLAEISSDIDQLNPESADLRALAKHLYD
 SYIKSFPLTKAKARAILTGKTTDKSPFVIYDMNSLMMGEDKIKFKHITPLQEQSKEVAIRIF
 15 QGCQFRSVEAVQEITEYAKSIPGFVNLDLNDQVTLKYGVEHIIYTMLASLMNKDGVLI SEG
 QGFMTRFLKSLRKPFPGDFMEPKFEFAVKFNALELDDSDLAIFIAVILSGDRPGLLNKPI
 EDIQDNLLQALELQLKLNHPESQLFAKLLQKMTDLRQIVTEHVQLLQVIKKTETDMSLHPL
 LQEIYKDLYAWAILTGKTTDKSPFVIYDMNSLMMGEDKIKFKHITPLQEQSKEVAIRIFQGC
 QFRSVEAVQEITEYAKSIPGFVNLDLNDQVTLKYGVEHIIYTMLASLMNKDGVLI SEGQGF
 20 MTREFLKSLRKPFPGDFMEPKFEFAVKFNALELDDSDLAIFIAVILSGDRPGLLNKPIEDI
 QDNLLQALELQLKLNHPESQLFAKLLQKMTDLRQIVTEHVQLLQVIKKTETDMSLHPLLQE
 IYKDLY

L'invention concerne aussi tout variant de la séquence SEQ ID NO: 24 conservant
 25 une activité de type PPAR (la capacité d'activer, en présence d'un ligand de PPAR
 tel que BRL49653, un promoteur comportant une séquence PPRE). Les variants
 s'entendent de tout mutant, délétant, et/ou polypeptide comportant un ou plusieurs
 résidus supplémentaires. Préférentiellement, un variant conservant 80% au moins
 des résidus de la séquence ID NO: 24.

30 En outre, l'invention concerne aussi tout acide nucléique codant pour un tel
 PPAR modifié. Il peut s'agir d'un ADN (notamment un ADNc ou un ADN
 synthétique ou semi-synthétique) ou d'un ARN. Cet ADN peut être construit selon
 les méthodes conventionnelles de biologie moléculaire connues de l'homme du
 métier (synthèse, ligations, criblage de banques, etc.). Il s'agit avantageusement
 35 de tout acide nucléique comprenant une séquence codant un polypeptide de
 séquence SEQ ID NO:24, ou hybridant avec une séquence codant un polypeptide

de SEQ ID NO: 24, et codant un polypeptide à activité de type PPAR. En outre, cet ADN peut comprendre un promoteur et/ou un terminateur transcriptionnel, par exemple.

5 Le second promoteur transcriptionnel, contrôlant l'expression de l'acide nucléique codant le PPAR, peut être tout promoteur fort ou faible, ubiquitaire ou sélectif, constitutif ou régulé, fonctionnel dans les cellules mammifères, en particulier dans les cellules humaines. Il peut s'agir d'un promoteur cellulaire domestique (i.e., d'un gène mammifère, en particulier humain), d'un promoteur viral, bactérien, d'insecte, de plante, naturel ou synthétique, simple ou complexe,
10 etc. Des exemples de promoteurs appropriés pour cet élément (b) sont notamment des promoteurs viraux (promoteur immédiat du virus SV40, promoteur immédiat du virus CMV, LTR de rétrovirus, promoteur TK du virus de l'herpès) ou cellulaires (promoteur PGK, albumine, EF1 α , ou de gènes fortement exprimés dans le muscle comme : promoteur du gène de la créatine kinase musculaire (MCK), promoteurs
15 des gènes des différentes isoformes d'actine du muscle squelettique, promoteur du gène de la desmine, promoteur du gène de la vimentine, promoteurs des gènes de chaîne légère ou chaîne lourde de la myosine). Par ailleurs, le promoteur peut être modifié par introduction d'une ou plusieurs régions enhanceur, telle que la région enhanceur de l'intron 2 du gène de la globine bêta, enhancer du gène très précoce
20 du virus CMV, enhancer de EF1 α , de région(s) silencer, de régions conférant une spécificité tissulaire (par exemple des régions isolées à partir des promoteurs tissus spécifiques comme : promoteur du gène de la créatine kinase musculaire (MCK), promoteurs des gènes des différentes isoformes d'actine du muscle squelettique, promoteur du gène de la desmine, promoteur du gène de la
25 vimentine, promoteurs des gènes de chaîne légère ou chaîne lourde de la myosine) ou un caractère régulable, ou par délétion de régions non essentielles à l'activité, par exemple. De tels promoteurs peuvent être utilisés pour exprimer le RXR, compris dans l'élément (d).

Des exemples préférés de second promoteur sont les promoteurs viraux, notamment le promoteur précoce du virus SV40 et le promoteur immédiat du CMV, ou des dérivés de ceux-ci.

5 Par ailleurs, dans un mode particulier de mise en œuvre, lorsque les éléments (a) et (b), et éventuellement (d), sont assemblés dans une même construction génétique, le second promoteur transcriptionnel (de l'élément (b)) et le promoteur inductible de l'élément (a), et éventuellement le promoteur de l'élément (d), peuvent être groupés pour ne former qu'une région promotrice commune, notamment bidirectionnelle, comme il sera expliqué en détail dans la suite du texte.

10 A cet effet, un autre objet de la présente invention réside dans un vecteur comprenant un élément (a) et un élément (b), et éventuellement un élément (d), tels que définis ci-avant.

Selon une première variante de l'invention, les éléments (a) et (b), et éventuellement (d), sont dans la même orientation dans le vecteur. Une telle variante est illustrée par exemple par le plasmide SV-g2-J10-C-pGL3 (figure 17).

15 Selon une autre variante de l'invention, les éléments (a) et (b), et éventuellement (d), sont en orientation opposée dans le vecteur. Une telle variante est illustrée par exemple par les plasmides représentés sur les figures 16, 18 et 19. Plus préférentiellement, dans cette variante de réalisation, le promoteur inductible de l'élément (a) et le promoteur transcriptionnel de l'élément (b) sont
20 assemblés dans le vecteur pour former un promoteur bidirectionnel régulable. Un tel mode de mise en œuvre est illustré par exemple par les plasmides représentés sur les figures 18 et 19.

A cet égard, un objet particulier de l'invention réside dans un vecteur
25 caractérisé en ce qu'il comprend, dans le sens 5'→3', un premier acide nucléique codant un PPAR, un premier promoteur transcriptionnel minimal contrôlant l'expression dudit premier acide nucléique, un ou plusieurs élément(s) de réponse à un PPAR, un deuxième promoteur transcriptionnel minimal et, sous le contrôle dudit deuxième promoteur transcriptionnel minimal, un deuxième acide nucléique
30 codant un produit d'intérêt.

Ce type de construction est avantageux puisqu'il permet la co-expression des deux acides nucléiques dans le même plasmide, et l'amplification de cette expression par la régulation des deux acides nucléiques par les PPAR et leurs ligands.

5 L'expression de l'acide nucléique d'intérêt dans les compositions de l'invention est activée généralement en présence d'un ligand de PPAR (élément (c)). A cet égard, selon le PPAR utilisé, différents types de ligands peuvent être utilisés, naturels ou synthétiques.

10 Ainsi, les ligands activateurs des PPAR α sont par exemple les fibrates tels que l'acide fibrique et ses analogues. Comme analogues de l'acide fibrique on peut mentionner notamment le gemfibrozyl (Atherosclerosis 114(1) (1995) 61), le bezafibrate (Hepatology 21 (1995) 1025), le ciprofibrate (BCE&M 9(4) (1995) 825), le clofibrate (Drug Safety 11 (1994) 301), le fénofibrate (Fenofibrate Monograph, Oxford Clinical Communications, 1995), le clinofibrate (Kidney International. 44(6)
15 (1993) 1352), l'acide pirinixique (Wy-14,643) ou l'acide 5,8,11,14-eicosatétranoïque (ETYA). Ces différents composés sont compatibles avec une utilisation biologique et/ou pharmacologique in vitro ou in vivo.

Les ligands activateurs des PPAR γ peuvent être choisis parmi les ligands naturels et synthétiques. Comme ligands naturels, on peut mentionner les acides
20 gras et les eicosanoïdes (par exemple l'acide linoléique, l'acide linolénique, le 9-HODE, le 5-HODE) et comme ligands synthétiques on peut mentionner les thiazolidinediones, telles que notamment la rosiglitazone (BRL49653), la pioglitazone ou la troglitazone (voir par exemple Krey G. et coll., *Mol. Endocrinol.*, 11 (1997) 779-791 ou Kliewer S. et Willson T., *Curr. Opin. in Gen. Dev.* 8 (1998)
25 576-581) ou le composé RG12525.

Par ailleurs, les compositions selon l'invention peuvent comporter plusieurs activateurs de PPAR en association, et en particulier un fibrate ou un analogue de fibrate associé à un rétinoïde.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'une composition ou d'un vecteur tels que définis ci-avant pour exprimer un acide nucléique d'intérêt dans une cellule ex vivo ou in vitro.

5 A cet égard, l'acide nucléique peut être tout acide nucléique (ADN, ARN) codant pour un produit d'intérêt (ARN, protéine, polypeptide, peptide, etc.). Il peut s'agir d'un produit d'intérêt agroalimentaire, thérapeutique, vaccinal, d'un marqueur, etc.

10 L'invention concerne aussi l'utilisation d'une composition ou d'un vecteur tels que définis ci-avant pour la préparation d'un produit destiné à exprimer un acide nucléique d'intérêt dans une cellule in vivo.

L'invention a encore pour objet un procédé pour l'expression régulée d'un acide nucléique dans une cellule, comprenant la mise en contact de ladite cellule avec une composition ou un vecteur tels que définis ci-avant.

15 Pour un usage in vitro ou ex vivo, les cellules peuvent être mises en contact avec les compositions ou vecteurs de l'invention selon différents protocoles. Ainsi, les cellules en culture peuvent être incubées directement avec les éléments (a), (b) et (c), et éventuellement (d), de l'invention, par exemple avec un vecteur comportant les éléments (a) et (b) et en présence du ligand (c). De manière alternative, les cellules peuvent être incubées dans un premier temps avec les
20 éléments (a) et (b) et éventuellement (d) (notamment assemblés dans un même vecteur) puis, dans un deuxième temps (après culture et éventuellement sélection des cellules modifiées), l'élément (c) peut être ajouté. Ce dernier type de protocole permet par exemple de découpler la phase de culture (ou d'expansion des cellules) de la phase d'expression de l'acide nucléique. Ces expériences peuvent
25 être réalisées dans tout dispositif et milieu approprié, de préférence en plaque, boîte, flasque, en condition stérile. Les quantités de cellules, vecteur et ligand peuvent être aisément adaptées par l'homme du métier, sur la base des informations fournies dans les exemples et de ses connaissances générales.

30 Pour une utilisation in vivo, les cellules (ou organes, tissu, etc.) sont mises en contact par administration des éléments (a), (b) et (c), et éventuellement (d), in

vivo, de manière simultanée, séparée ou espacée dans le temps. A cet effet, les éléments (a) et (b), et éventuellement (d), éventuellement sous forme d'une construction génétique unique, sont généralement administrés par voie parentérale, en particulier intramusculaire, intraveineuse, sous-cutanée, intradermique, intratumorale ou stéréotaxique. Le choix du mode d'administration peut être guidé par l'application envisagée, le tissu ciblé et/ou le type de produit d'intérêt codé par le transgène. Pour cette administration, les compositions de l'invention peuvent comprendre tout agent favorisant la transfection cellulaire (polymère cationique, lipide, etc.). Dans un mode particulier, les compositions sont administrées par voie intramusculaire, et les constructions génétiques sont utilisées sous forme d'acide nucléique "nu", c'est-à-dire sans agent de transfection ajouté.

De même, lorsque les éléments (a) et (b), et éventuellement (d), sont introduits au moyen de vecteurs viraux, aucun agent de transfection supplémentaire n'est nécessaire.

Comme il est illustré dans les exemples, le ligand (c) peut être administré avant, simultanément, ou après les éléments (a) et (b), et éventuellement (d),.

A cet égard, l'administration du ligand peut être réalisée par voie orale, anale, intraveineuse, intrapéritonéale ou intramusculaire, par exemple.

Les doses utilisées peuvent être adaptées par l'homme du métier, sur la base des données in vivo publiées dans la littérature. Ainsi par exemple, pour une forme non soluble dans l'eau, des doses typiques de ligand tel que BRL 49653 sont comprises entre 5 et 50 mg/kg, par exemple 30 mg/kg, permettant d'obtenir une concentration plasmatique proche de 15µg/ml environ, au moins. Pour une forme hydrosoluble de ligand, dont la biodisponibilité est plus grande (par exemple un sel de maleate du BRL49653) les doses typiques sont plus faibles, généralement inférieures à 5 mg/kg, par exemple de 0,01 à 1 mg/kg. Ces doses peuvent bien évidemment être adaptées par l'homme du métier en fonction des constructions utilisées, des ligands utilisés, et des applications et effets recherchés. D'une manière générale, les résultats présentés dans les exemples montrent

avantageusement que les compositions de l'invention permettent d'obtenir in vivo une expression forte et régulée, à des doses de ligand inférieures à celles utilisées habituellement. En outre, bien que des administrations répétées de ligand peuvent être réalisées, les résultats présentés montrent aussi que l'expression est forte
5 après une prise unique de ligand.

De manière générale, les doses de vecteur utilisées peuvent varier entre 0,01 et 1000 µg, ou plus, selon les applications recherchées.

L'invention peut être utilisée pour exprimer un gène dans différents types de cellules, de tissus ou d'organes, in vitro, ex vivo ou in vivo. En particulier, il peut
10 s'agir d'une cellule, d'un tissu ou d'un organe mammifère, de préférence humain. A titre illustratif, on peut citer les cellules musculaires (ou un muscle), hépatiques (ou le foie), cardiaques (ou le cœur, la paroi artérielle ou vasculaire), nerveuses (ou le cerveau, la moelle, etc) ou tumorales (ou une tumeur).

Préférentiellement, les constructions, compositions et procédé de l'invention
15 sont utilisés pour l'expression régulée d'un acide nucléique dans une cellule musculaire (ou un muscle) in vitro, ex vivo ou in vivo. Les résultats présentés dans les exemples illustrent plus particulièrement les avantages de l'invention in vivo ou in vitro dans ce type de cellules.

L'invention concerne aussi toute cellule modifiée par mise en contact avec
20 une composition ou un vecteur tels que définis ci-avant.

L'invention concerne également l'utilisation d'une composition, d'un vecteur ou d'une cellule tels que définis ci-avant, dans lesquels l'acide nucléique d'intérêt est un gène reporter (tel que par exemple la luciférase ou la phosphatase alcaline sécrétée) pour le criblage in vitro, ex vivo ou in vivo (en particulier dans les cellules
25 musculaires ou un muscle) de ligands des PPAR. A cet égard, l'invention décrit aussi un procédé d'identification de ligands des PPAR comprenant la mise en contact d'une cellule telle que définie ci-avant avec une molécule (ou composition) test, et la mise en évidence d'une expression de l'acide nucléique d'intérêt (celui-ci étant préférentiellement un gène reporter). L'expression peut en outre être

comparée à celle observée en l'absence de composé test ou en présence d'un ligand de référence, afin d'évaluer l'activité du composé testé.

L'invention concerne également l'utilisation d'une composition ou d'un vecteur tels que définis ci-avant, pour la construction d'animaux transgéniques, notamment de mammifères non-humains, utiles pour des études précliniques, ou pour des études de biodisponibilité, de marquage, etc.

La présente invention sera décrite plus en détails à l'aide des exemples qui suivent qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

10 **LEGENDE DES FIGURES**

Figure 1 : Représentation schématique du plasmide FTKpGL3.

Figure 2 : Représentation schématique du plasmide Jx3S-TK-pGL3.

15

Figure 3 : Représentation schématique du plasmide Jx3AS-TK-pGL3.

Figure 4 : Représentation schématique du plasmide DR1x3S-TK-pGL3.

20 **Figure 5 :** Représentation schématique du plasmide DR1x3AS-TK-pGL3.

Figure 6 : Activités des promoteurs inductibles évaluées en transfections transitoires in vitro dans des myoblastes de souris (C2C12). Les cellules sont cotransfectées avec : (i) 10 ng de plasmide FTKpGL3 (a), ou Jx3S-TK-pGL3 (b), ou Jx3AS-TK-pGL3 (c), ou DR1x3S-TK-pGL3 (d), ou DR1x3AS-TK-pGL3 (e), (ii) des quantités croissantes de plasmide pSG5-hPPAR γ 2, et (iii) 20 ng de plasmide pRL-null. L'activité de chaque promoteur inductible représente l'activité luciférase de Photinus pyralis normalisée par l'activité de la luciférase de Renilla reniformis.

25

Figure 7 : Activités des promoteurs inductibles évaluées en transfections transitoires in vitro dans des myoblastes de souris (C2C12). Les cellules sont cotransfectées avec : (i) 10 ng de plasmide FTKpGL3 (a), ou Jx3S-TK-pGL3 (b), ou Jx3AS-TK-pGL3 (c), ou DR1x3S-TK-pGL3 (d), ou DR1x3AS-TK-pGL3 (e), (ii) des quantités croissantes de plasmide pSG5-hPPAR α (Koz), et (iii) 20 ng de plasmide pRL-null. L'activité de chaque promoteur inductible représente l'activité luciférase de Photinus pyralis normalisée par l'activité de la luciférase de Renilla reniformis.

Figure 8 : Représentation schématique du plasmide Jx5AS-CMV-pGL3.

Figure 9 : Activités des promoteurs inductibles évaluées en transfections transitoires in vitro dans des myoblastes de souris (C2C12). Les cellules sont cotransfectées avec : (i) 10 ng de plasmide Jx5AS-TK-pGL3 (a), ou Jx5AS-CMV-pGL3 (b), (ii) des quantités croissantes de plasmide pSG5-hPPAR γ 2, et (iii) 20 ng de plasmide pRL-null. L'activité de chaque promoteur inductible représente l'activité luciférase de Photinus pyralis normalisée par l'activité de la luciférase de Renilla reniformis.

Figure 10 : Activités des promoteurs inductibles évaluées en transfections transitoires in vitro dans des myoblastes de souris (C2C12). Les cellules sont cotransfectées avec : (i) 10 ng de plasmide JxnAS-TK-pGL3, (ii) 10 ng de plasmide pSG5-hPPAR γ 2, et (iii) 20 ng de plasmide pRL-null. L'activité de chaque promoteur inductible représente l'activité luciférase de Photinus pyralis normalisée par l'activité de la luciférase de Renilla reniformis.

Figure 11 : Activités des promoteurs inductibles évaluées en transfections transitoires in vitro dans des myoblastes de souris (C2C12). Les cellules sont cotransfectées avec : (i) 10 ng de plasmide JxnAS-CMV-pGL3, (ii) 10 ng (a) ou 50 ng (b) de plasmide pSG5-hPPAR γ 2, et (iii) 20 ng de plasmide pRL-null. L'activité

de chaque promoteur inductible représente l'activité luciférase de Photinus pyralis normalisée par l'activité de la luciférase de Renilla reniformis.

Figure 12 : Représentation schématique du plasmide pSG5-hPPARg2g2.

5

Figure 13 : Comparaison des régulateurs transcriptionnels hPPARg2 et hPPARg2g2. Des myoblastes de souris (C2C12) sont cotransfectés avec : (i) 10 ng de plasmide Jx10AS-CMV-pGL3, (ii) des quantités croissantes de plasmide pSG5-hPPARg2 (a) ou pSG5-hPPARg2g2 (b), et (iii) 20 ng de plasmide pRL-null. L'activité du promoteur inductible représente l'activité luciférase de Photinus pyralis normalisée par l'activité de la luciférase de Renilla reniformis. (c) : facteurs d'induction par le BRL49653 obtenus avec le plasmide pSG5-hPPARg2 ou le plasmide pSG5-hPPARg2g2. Ce facteur d'induction est calculé en divisant l'activité en présence de BRL49653 par l'activité en présence de DMSO.

15

Figure 14 : Représentation schématique du plasmide Jx10AS-CMV-EF-pGL3.

Figure 15 : Activités des promoteurs inductibles évaluées en transfections transitoires in vitro dans des myoblastes de souris (C2C12). Les cellules sont cotransfectées avec : (i) 10 ng de plasmide Jx10AS-CMV-pGL3 (a), ou Jx10AS-CMV-EF-pGL3 (b), (ii) des quantités croissantes de plasmide pSG5-hPPARg2g2, et (iii) 20 ng de plasmide pRL-null. L'activité de chaque promoteur inductible représente l'activité luciférase de Photinus pyralis normalisée par l'activité de la luciférase de Renilla reniformis.

25

Figure 16 : Représentation schématique du plasmide Jx5AS-TK-luc-hPPARg2.

Figure 17 : Représentation schématique du plasmide SV-g2-J10-C-pGL3.

Figure 18 : Représentation schématique du plasmide hPPARg2-CMV-Jx5AS-TK-pGL3.

Figure 19 : Représentation schématique du plasmide hPPARg2-CMV-Jx10AS-CMV-pGL3.

Figure 20 : Comparaison des différentes versions du système inductible in vitro. Des myoblastes de souris (C2C12) sont transfectés avec, pour chaque version du système, le même nombre de moles de cassettes d'expression inductible. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité du promoteur hCMV-IE, obtenue en utilisant le plasmide pCMV-leadTK. Les facteurs d'induction par le BRL49653 sont calculés en divisant l'activité en présence de BRL49653 par l'activité en présence de DMSO. 1 = pSG5-hPPARg2 + Jx5AS-TK-pGL3 ; 2 = Jx5AS-TK-luc-hPPARg2 ; 3 = pSG5-hPPARg2g2 + Jx10AS-CMV-pGL3 ; 4 = pSG5-hPPARg2 + Jx10AS-CMV-pGL3 ; 5 = SV-g2-J10-C-pGL3 ; 6 = hPPARg2-CMV-Jx5AS-TK-pGL3 ; 7 = hPPARg2-CMV-Jx10AS-CMV-pGL3 ; 8 = hPPARg2-CMV-Jx15AS-CMV-pGL3 ; 9 = hPPARg2-CMV-Jx20AS-CMV-pGL3.

Figure 21 : Comparaison in vitro des ligands BRL49653 et RG12525. Des myoblastes de souris (C2C12) sont transfectés avec : (i) 10 ng de plasmide hPPARg2-CMV-Jx10AS-CMV-pGL3 dont la cassette d'expression est présentée en (a) et (ii) 10 ng de plasmide pRL-null. (b) L'activité du promoteur inductible représente l'activité luciférase de Photinus pyralis normalisée par l'activité de la luciférase de Renilla reniformis.

25

Figure 22 : Comparaison de différentes versions du système inductible in vivo. Des souris C57Bl/6 (6 souris par groupe) sont injectées en bilatéral, dans le tibial cranial, avec, pour chaque version du système, le même nombre de moles de cassettes d'expression inductible. Un électrotransfert est alors appliqué sur chaque muscle. Les animaux traités reçoivent chaque jour, par gavage, 30 mg / kg de

30

BRL49653. Quatre jours après l'injection d'ADN, les animaux sont sacrifiés et les muscles sont prélevés pour mesurer l'activité luciférase. 1 = pCMV-leadTK ; 2 = pSG5-hPPARg2 + Jx10AS-CMV-pGL3 ; 3 = pSG5-hPPARg2g2 + Jx10AS-CMV-pGL3 ; 4 = hPPARg2-CMV-Jx10AS-CMV-pGL3.

5

Figure 23 : Comparaison, in vivo, de différents protocoles d'induction au BRL49653. Des souris C57Bl/6 (6 souris par groupe) sont injectées en bilatéral, dans le tibial cranial, avec 10 µg d'ADN contenant 1 µg du plasmide hPPARg2-CMV-Jx10AS-CMV-pGL3 dont la cassette d'expression est présentée en (a). Les activités obtenues avec les différents protocoles d'induction sont rassemblées dans le panneau (b).

10

MATERIELS ET METHODES

15

20

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose, la purification de fragments d'ADN par électroélution, la précipitation d'ADN plasmidique en milieu salin par l'éthanol ou l'isopropanol, la transformation dans Escherichia coli sont bien connues de l'homme de l'art et sont abondamment décrites dans la littérature (Sambrook et coll., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

25

30

Le plasmide pGL3-Basic, utilisé pour les clonages des différentes régions promotrices, ainsi que le plasmide pRL-null, sont d'origine commerciale (Promega Corporation). Les plasmides pSG5 (Stratagene), pBluescript II SK+ (Stratagene) et pSL301 (Invitrogen Corporation) sont également d'origine commerciale. Les constructions des plasmides d'expression pSG5-hPPARg2 (Fajas L. et coll., *J. Biol. Chem.*, **272** (1997) 18779-18789) et pSG5-hPPARα(Koz) (Gervois P. et coll. *Mol. Endocrinol.*, **13** (1999) 400-409) ont été précédemment décrites.

La construction du plasmide pCMV-leadTK a également été décrite précédemment dans la demande de brevet FR 98/12000 déposée le 25/09/98, et dans la demande de brevet US SN 60/123,298 (provisional application).

Il est rappelé que ce plasmide est construit de la manière suivante. Le vecteur d'expression pCGN précédemment décrit par Tanaka et coll. (*Cell*, 60 (1990) 375-386) contient le promoteur CMV (-522/+72) fusionné au "leader" du gène tk de HSV (+51/+101) en amont d'une séquence codant pour l'épitope de l'hémagglutinine. Le plasmide pCGN (10 ng) a été utilisé comme matrice pour une amplification ACP. Les amorces qui ont été utilisées sont les suivantes :

10 - Amorce 6718 (5' CCCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCG 3') (SEQ ID 26), cette amorce s'hybride avec le promoteur CMV en position -522 (8 nucléotides en aval du site EcoRI de pCGN).

- Amorce 6719 (5' GGGACGCGCTTCTACAAGGCGCTGGCCGAA 3') (SEQ ID 27), cette amorce s'hybride jusqu'en position 101 du "leader" tk. Le premier nucléotides G en gras est destiné à restaurer le site NcoI de pGL3-Basic comme sera explicité ci dessous.

15

Le fragment d'ACP ainsi obtenu est purifié puis phosphorylé à l'aide de la polynucléotide kinase du phage T4 (New England Biolabs). Parallèlement, le vecteur pGL3-Basic (Proméga) a été linéarisé par NcoI, purifié puis traité par la Klenow ADN polymérase (Boehringer Mannheim) afin de remplir le site NcoI. Ce vecteur est ensuite déphosphorylé à l'aide de la phosphatase alcaline (Boehringer Mannheim) puis utilisé pour l'insertion du fragment d'ACP phosphorylé. Ainsi, la guanosine (G) de l'amorce 6719 permet de restaurer le site NcoI uniquement lorsque le fragment CMV-leader tk est orienté avec la partie 5' (amorce 6718, position -522 du CMV) en aval du site HindIII de pGL3-Basic et son extrémité 3' (amorce 6719, leader tk) est ligaturée au site NcoI de pGL3-Basic (premier ATG de la luciférase). Le plasmide ainsi obtenu est désigné pCMV-leadTK.

20

25

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique d'ACP (Amplification en Chaîne par la Polymerase) peut être effectuée en utilisant un DNA thermal cyclerTM (Perkin Elmer Cetus) selon les recommandations du fabricant.

5

L'électroporation d'ADN plasmidique dans des cellules d'Escherichia coli peut être réalisée à l'aide d'un électroporateur (Bio-Rad) selon les recommandations du fabricant.

10

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et coll. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74** (1977) 5463-5467) en utilisant le kit distribué par Applied Biosystems selon les recommandations du fabricant.

15

Les myoblastes murins C2C12 sont cultivés en milieu DMEMTM (Life Technologies Inc.) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF). Les cultures sont réalisées dans une étuve à 37°C, en atmosphère humide et sous une pression partielle en CO₂ de 5%.

20

Les transfections sont réalisées en plaques 24 puits et chaque transfection est effectuée trois fois. Vingt quatre heures avant la transfection, les cellules sontensemencées à 3×10^4 cellules par puits en milieu DMEMTM. Pour chaque puits, 500 ng d'ADN plasmidique (plasmides d'intérêt et pBluescript II SK+ pour compléter à 500 ng) sont mélangés au lipide cationique RPR120535 B (WO97/18185) à raison de 6 nmoles de lipide par µg d'ADN dans du milieu DMEMTM (20 µl final) comprenant 150 mM de NaCl et 50 mM de bicarbonate. Après 20 minutes à température ambiante, les 20 µl du mélange ADN/lipide sont mis en contact avec les cellules, en absence de SVF, durant 2 heures. Le milieu de culture est alors supplémenté en SVF ou en ULTROSERTM (BioSeptra Inc.) de manière à obtenir une concentration finale de respectivement 10% ou 2%. Les

30

ligands des PPAR, dissous dans du DMSO, sont ajoutés dans le milieu de culture en même temps que le SVF ou l'ULTROSER™. Quarante huit heures après la transfection, le milieu de culture est retiré et les cellules sont rincées deux fois avec du PBS (Life Technologies Inc.). L'activité de la luciférase de Photinus pyralis et l'activité de la luciférase de Renilla reniformis sont alors déterminées à l'aide du kit Dual-Luciferase Reporter Assay System™ (Promega Corporation) selon les recommandations du fournisseur.

Les expériences de transfert de gène in vivo sont réalisées sur des souris femelles C57Bl/6 âgées de 6 semaines. Les animaux sont anesthésiés avec 250 µl d'un mélange kétamine (Rhône Mérieux, 10 mg/ml final) / Xylazine (Bayer Pharma, 0,3 mg/ml final) par voie intrapéritonéale. Une injection d'une quantité totale de 10 µg d'ADN est alors réalisée dans chaque muscle tibial cranial. Chaque patte est ensuite soumise à un champ électrique (fréquence de 1 Hz; 4 pulses de 20 ms à 250 V/cm). Durant toute la durée de l'expérience, les animaux reçoivent chaque matin, par gavage, soit 30 mg/kg de BRL49653 (SmithKline Beecham) en carboxycellulose 1% (poids/volume), soit la carboxycellulose 1% seule. Quatre jours après le transfert de gène, les animaux sont sacrifiés et les muscles prélevés en tampon de lyse PLB™ (Promega Corporation) dans des tubes Lysing Matrix™ (BIO 101, Inc.). Le broyage des muscles, qui permet d'extraire la luciférase, est réalisé à l'aide de l'appareil FastPrep™ (BIO 101, Inc.) durant 25 secondes à 6,5 m/s. L'activité de la luciférase de Photinus pyralis est alors déterminée à l'aide du kit Luciferase Assay System™ (Promega Corporation) selon les recommandations du fournisseur.

25

EXEMPLES

EXEMPLE 1 : Construction de promoteurs inductibles par les PPAR et de plasmides d'expression les contenant.

1.1. Plasmide FTKpGL3.

Un fragment d'ADN, correspondant à une partie du promoteur du gène TK du virus herpès simplex de type 1 (HSV-1), compris entre les positions -105 et +56 par rapport au site d'initiation de la transcription, a été amplifié par ACP en utilisant le plasmide pBLCAT2 (Luckow B. et Schutz G., *Nucleic Acids Res.*, **15** (1987) 5490) comme matrice et les oligonucléotides 5' CGA CTC TAG AAG ATC TTG CCC CGC CCA GCG 3' (SEQ ID NO: 28) et 5' TCG CCA AGC TTC TCG TGA TCT GCG GCA 3' (SEQ ID NO: 2) comme amorces. Ce fragment a été digéré par BglII et HindIII puis a été cloné dans le plasmide pGL3-Basic préalablement digéré par BglII et HindIII pour obtenir le plasmide FTKpGL3. Une représentation schématique de ce plasmide est présentée dans la figure 1.

1.2. Plasmides JxnS-TK-pGL3.

Un fragment d'ADN, contenant un ou plusieurs (n) sites J du promoteur du gène de l'ApoA-II humaine, a été amplifié par ACP en utilisant le plasmide J3TKpGL3 (Vu-Dac N. et coll., *J. Clin. Invest.*, **96** (1995) 741-750) comme matrice et les oligonucléotides 3RDA37 (5' ACG TGT CGA CAC TAG TGG CTA GAG GAT CTC TAC CAG G 3' ; SEQ ID NO: 3) et 4RDA48 (5' CGA TGG TAC CCT CGA GCA ATG TGC TAG CGA GAT CCT TCA ACC TTT ACC 3' ; SEQ ID NO: 4) comme amorces. Ce fragment a été digéré par XhoI et SpeI puis a été cloné dans le plasmide FTKpGL3 préalablement digéré par XhoI et NheI, dans le sens de la transcription du promoteur minimal TK (S), pour obtenir les plasmides Jx1S-TK-pGL3, Jx2S-TK-pGL3 et Jx3S-TK-pGL3, selon le nombre de sites J présents. Une représentation schématique du plasmide Jx3S-TK-pGL3 est présentée dans la figure 2.

Le fragment d'ADN, amplifié par ACP en utilisant le plasmide J3TKpGL3 et les oligonucléotides 3RDA37 et 4RDA48 comme amorces, digéré par XhoI et SpeI, a également été cloné dans le plasmide Jx3S-TK-pGL3 préalablement digéré par XhoI et NheI pour obtenir les plasmides Jx4S-TK-pGL3, Jx5S-TK-pGL3 et Jx6S-TK-pGL3, selon le nombre de sites J présents.

1.3. Plasmides JxnAS-TK-pGL3.

Les plasmides JxnAS-TK-pGL3 diffèrent des plasmides JxnS-TK-pGL3 par l'orientation des sites J présents dans le promoteur inductible. Un fragment d'ADN, contenant un ou plusieurs sites J du promoteur du gène de l'ApoA-II humaine, a été amplifié par ACP en utilisant le plasmide J3TKpGL3 comme matrice et les oligonucléotides 3RDA37 et 4RDA48 comme amorces. Ce fragment a été digéré par Sall et NheI puis a été cloné, dans le sens inverse de la transcription du promoteur minimal TK (AS), dans le plasmide FTKpGL3 préalablement digéré par XhoI et NheI pour obtenir les plasmides Jx1AS-TK-pGL3, Jx2AS-TK-pGL3 et Jx3AS-TK-pGL3, selon le nombre de sites J présents. Une représentation schématique du plasmide Jx3AS-TK-pGL3 est présentée dans la figure 3.

Le fragment d'ADN, amplifié par ACP en utilisant le plasmide J3TKpGL3 et les oligonucléotides 3RDA37 et 4RDA48 comme amorces, digéré par KpnI et SpeI, a également été cloné dans l'orientation antisens (AS) dans le plasmide Jx3AS-TK-pGL3 préalablement digéré par KpnI et NheI pour obtenir les plasmides Jx4AS-TK-pGL3 et Jx5AS-TK-pGL3 selon le nombre de sites J présents.

1.4. Plasmides DR1xnS-TK-pGL3.

Ces plasmides contiennent, comme élément de réponse aux PPAR (PPRE), une séquence consensus (AGGTCA A AGGTCA , SEQ ID NO: 5) appelée DR1

consensus. Un fragment d'ADN, contenant un ou plusieurs sites DR1 consensus, a été amplifié par ACP en utilisant les oligonucléotides 1RDA69 (5' ACG TGT CGA CAC TAG TCA AAA CTA GGT CAA AGG TCA CGG AAA ACT AGG TCA AAG GTC ACG GAA AAC TAG 3' ; SEQ ID NO: 6) et 2RDA64 (5' CGA TGG TAC CCT CGA GCA ATG TGC TAG CCG TGA CCT TTG ACC TAG TTT TCC GTG ACC TTT GAC C 3' ; SEQ ID NO: 7) comme amorces. Ce fragment a été digéré par XhoI et SpeI puis a été cloné, dans l'orientation sens, dans le plasmide FTKpGL3 préalablement digéré par XhoI et NheI pour obtenir les plasmides DR1x2S-TK-pGL3 et DR1x3S-TK-pGL3, selon le nombre de sites DR1 consensus présents.

Une représentation schématique du plasmide DR1x3S-TK-pGL3 est présentée dans la figure 4.

Le fragment d'ADN, amplifié par ACP en utilisant les oligonucléotides 1RDA69 et 2RDA64 comme amorces, digéré par XhoI et SpeI, a également été cloné dans le plasmide DR1x3S-TK-pGL3 préalablement digéré par XhoI et NheI pour obtenir les plasmides DR1x5S-TK-pGL3, DR1x6S-TK-pGL3 et DR1x7S-TK-pGL3, selon le nombre de sites DR1 consensus présents.

1.5. Plasmides DR1xnAS-TK-pGL3.

Les plasmides DR1xnAS-TK-pGL3 diffèrent des plasmides DR1xnS-TK-pGL3 par l'orientation des sites DR1 consensus présents dans le promoteur inductible. Un fragment d'ADN, contenant une ou plusieurs séquences DR1 consensus, a été amplifié par ACP en utilisant les oligonucléotides 1RDA69 et 2RDA64 comme amorces. Ce fragment a été digéré par Sall et NheI puis a été cloné, dans l'orientation antisens, dans le plasmide FTKpGL3 préalablement digéré par XhoI et NheI pour obtenir les plasmides DR1x2AS-TK-pGL3 et DR1x3AS-TK-pGL3, selon le nombre de sites DR1 consensus présents. Une représentation schématique du plasmide DR1x3AS-TK-pGL3 est présentée dans la figure 5.

Le fragment d'ADN, amplifié par ACP en utilisant les oligonucléotides 1RDA69 et 2RDA64 comme amorces, digéré par KpnI et SpeI, a également été cloné dans le plasmide DR1x3AS-TK-pGL3 préalablement digéré par KpnI et NheI pour obtenir les plasmides DR1x5AS-TK-pGL3 et DR1x6AS-TK-pGL3 selon le nombre de sites DR1 consensus présents.

EXEMPLE 2 : Spécificité des PPAR pour différents éléments de réponse .

2.1. Système utilisant hPPARg2.

L'activité des promoteurs inductibles, en utilisant hPPARg2 comme régulateur transcriptionnel, a été évaluée en transfection transitoire dans des myoblastes de souris (figure 6). Les résultats montrent que, selon l'élément de réponse utilisé (PPRE), l'induction par le ligand de hPPARg2 (BRL49653) et l'activité finale après activation varient. Les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant des sites J comme PPRE. De plus, l'orientation du PPRE est également importante. Dans le cas du site J, l'orientation AS est plus favorable (Panneau c).

2.2. Système utilisant hPPARa.

Les résultats obtenus avec hPPARa comme régulateur transcriptionnel, sont rassemblés dans la figure 7. Contrairement au hPPARg2, c'est le DR1 consensus qui est le meilleur PPRE pour hPPARa (Panneaux d et e)

Ces résultats montrent donc (1) la fonctionnalité des plasmides de l'invention et (2) que selon le PPAR choisi dans le système inductible, il est important de sélectionner le PPRE le plus adapté au régulateur transcriptionnel. Ce choix peut influencer le facteur d'induction dû à la présence du ligand mais également le

niveau d'activité atteint après induction. Il est bien entendu que d'autres PPRE peuvent être utilisés dans le système de l'invention.

5 **EXEMPLE 3 : Construction de promoteurs inductibles par les PPAR contenant un promoteur minimum autre que celui de HSV1-TK comme par exemple le promoteur minimum de hCMV-IE.**

10 **3.1. Construction des plasmides contenant le promoteur minimum de hCMV-IE.**

Un fragment d'ADN, contenant le promoteur minimum de hCMV-IE (de la position -54 à la position +48 par rapport au site d'initiation de la transcription), a été amplifié par ACP en utilisant le plasmide pCMV β (Clontech) comme matrice et les oligonucléotides 5RDA32 (5' ACG TAG ATC TCG GTA GGC GTG TAC GGT GGG AG 3' ; SEQ. ID NO: 8) et 6RDA29 (5' ACG TAA GCT TCT ATG GAG GTC AAA ACA GC 3' ; SEQ ID NO: 9) comme amorces. Ce fragment a été digéré par HindIII et BglII puis a été cloné dans le plasmide FTKpGL3 préalablement digéré par HindIII et BglII pour obtenir le plasmide FCMVpGL3.

20 Le plasmide Jx5AS-TK-pGL3 a été digéré par BglII et NheI pour isoler le fragment BglII-NheI de 179 pb contenant 5 copies du site J. Ce fragment a été inséré dans le plasmide FCMVpGL3 préalablement digéré par BglII et NheI pour donner le plasmide Jx5AS-CMV-pGL3. Une représentation schématique du plasmide Jx5AS-CMV-pGL3 est présentée dans la figure 8.

25 Le plasmide Jx5AS-CMV-pGL3 a été digéré par SphI et NheI pour isoler le fragment SphI-NheI de 982 pb contenant 5 copies du site J, le promoteur minimum hCMV-IE et la partie 5' du gène codant pour la luciférase. Ce fragment a été inséré dans le plasmide Jx5AS-CMV-pGL3 préalablement digéré par SphI et SpeI pour donner le plasmide Jx10AS-CMV-pGL3. Les plasmides Jx15AS-CMV-pGL3 et
30 Jx20AS-CMV-pGL3 ont également été obtenus en suivant la même stratégie.

3.2. Activité des plasmides contenant le promoteur minimum de hCMV-IE.

5 Une comparaison des promoteurs minimum pouvant être utilisés dans le système inductible a été réalisée en transfection transitoire. Les résultats, rassemblés dans la figure 9, montrent que selon le promoteur minimum, l'activité finale après induction peut varier d'un facteur deux. Ces résultats montrent en particulier que, dans les conditions testées, le promoteur CMV semble donner une
10 activité supérieure. Bien entendu, d'autres promoteurs minimum, comme des promoteurs ne contenant pas de boîte TATA, peuvent être utilisés.

15 **EXEMPLE 4 : Importance du nombre d'éléments de réponse présents dans les promoteurs inductibles .**

 L'optimisation du nombre de PPRE présents dans le promoteur inductible a été étudiée en transfection transitoire. Les résultats, présentés dans la figure 10, montrent que plus le nombre de copies du PPRE est important, plus le facteur
20 d'induction par le ligand et l'activité induite sont élevés. Par contre, si ce nombre est trop important, à la fois le facteur d'induction et l'activité induite diminuent, et ceci quelle que soit la quantité de hPPARg2 présente dans l'essai (figure 11). Le nombre de PPRE optimal semble compris entre 10 et 15.

25

EXEMPLE 5 : Construction d'un régulateur transcriptionnel fort m nt inductible par les ligands des PPAR.

30 5.1. Construction d'un régulateur transcriptionnel comprenant deux copies du domaine de liaison au ligand. Construction du plasmide pSG5-hPPARg2g2.

Un fragment d'ADN, noté A, contenant la région de l'ADN complémentaire de hPPARg2 codant pour la partie C-terminale du domaine F, a été amplifié par ACP en utilisant le plasmide pSG5-hPPARg2 comme matrice et les oligonucléotides

5 20RDA21 (5' GGT TTG CTG AAT GTG AAG CCC 3' ; SEQ ID NO: 10) et 21RDA42 (5' AGT CTC TAG AGC TAC GCG TAC AAG TCC TTG TAG ATC TCC TGC 3' ; SEQ ID NO: 11) comme amorces. Un fragment d'ADN, noté B, contenant la région de l'ADN complémentaire de hPPARg2 codant pour les domaines E et F, a été amplifié par ACP en utilisant le plasmide pSG5-hPPARg2 comme matrice et

10 les oligonucléotides 22RDA32 (5' AGT CAC GCG TGG GCG ATC TTG ACA GGA AAG AC 3' ; SEQ ID NO: 12) et 23RDA21 (5' GCC TTT GAG TGA GCT GAT ACC 3' ; SEQ ID NO: 13) comme amorces. Le fragment A, digéré par SacI et MluI et le fragment B, digéré par MluI et XbaI ont été clonés ensemble dans le plasmide pSG5-hPPARg2 préalablement digéré par SacI et XbaI pour obtenir le plasmide

15 pSG5-hPPARg2g2. Ce plasmide, dont une représentation schématique est présentée dans la figure 12, contient un ADN complémentaire qui code pour un régulateur transcriptionnel (noté hPPARg2g2) comprenant deux copies des domaines E et F, c'est à dire deux domaines de liaison au ligand.

La séquence complète du PPAR γ 2 est représentée ci-dessous (SEQ ID

20 NO: 24) :

25 MGETLGDSPIDPESDSFTDTLSANISQEMTMVDTEMPFWPTNFGISSVDLSVMEDHSHSFDI
 KPFTTVDFSSISTPHYEDIPFTRTPVVADYKYDLKLQEYQSAIKVEPASPPYYSEKTQLYN
 KPHEEPSNSLMAIECRVCGDKASGFHYGVHACEGCKGFFRRTIRLKLIIYDRCDLNCRIHKKS
 RNKCQYCRFQKCLAVGMSHNAIRFGRMPQAEKEKLLAEISSDIDQLNPESADLRALAKHLYD
 30 SYIKSFPLTKAKARAILTGKTTDKSPFVIYDMNSLMMGEDKIKFKHITPLQEQSKEVAIRIF
 QGCQFRSVEAVQEITEYAKSIPGFVNLDLNDQVTLKYGVEHIIYTMLASLMNKDGVLI SEG
 QGFMTRFLKSLRKPFQDFMEPKFEFAVKFNALELDDSDLAIFIAVIIISGDRPGLLNVPKI
 EDIQDNLLQALELQLKLNHPESQLFAKLLQKMTDLRQIVTEHVQLLQVIKKTETDMSLHPL
 LQEIYKDLYAWAILTGKTTDKSPFVIYDMNSLMMGEDKIKFKHITPLQEQSKEVAIRIFQGC
 35 QFRSVEAVQEITEYAKSIPGFVNLDLNDQVTLKYGVEHIIYTMLASLMNKDGVLI SEGQGF
 MTREFLKSLRKPFQDFMEPKFEFAVKFNALELDDSDLAIFIAVIIISGDRPGLLNVPKIEDI
 QDNLLQALELQLKLNHPESQLFAKLLQKMTDLRQIVTEHVQLLQVIKKTETDMSLHPLLQE
 IYKDLY

La séquence de la partie C-terminale de PPAR γ 2, comprenant les domaines E et F, est la séquence SEQ ID N° 25 suivante :

5 SEQ ID N° 25

MMGEDKIKFKHITPLQEQSKEVAIRIFQGCQFRSVEAVQEITEYAKSIPGFVNLDLNDQVTL
 LKYGVHEIIYTMLASLMNKDGVLISEGQGFMTREFLKSRLKPFGDFMEPKFEFAVKFNALEL
 DDSDLAI FIAVIIISGDRPGLLNVPKPIEDIQDNLLQALELQLKLNHPESSQLFAKLLQKMTD
 10 LRQIVTEHVQLLQVIKKTETDMSLHPLLQEIKDLYAWAILTGKTDDKSPFVIYDMNSLMMG
 EDKIKFKHITPLQEQSKEVAIRIFQGCQFRSVEAVQEITEYAKSIPGFVNLDLNDQVTL LKY
 GVHEIIYTMLASLMNKDGVLISEGQGFMTREFLKSRLKPFGDFMEPKFEFAVKFNALELDDSD
 LAIFIAVIIISGDRPGLLNVPKPIEDIQDNLLQALELQLKLNHPESSQLFAKLLQKMTDLRQ
 15 IVTEHVQLLQVIKKTETDMSLHPLLQEIKDLY

5.2. Activité du plasmide pSG5-hPPAR γ 2g2.

20 Les résultats présentés dans la figure 13 montrent que si l'activité induite est plus faible en utilisant hPPAR γ 2g2 comme régulateur transcriptionnel (figure 13 a et b), le facteur d'induction par le ligand (figure 13 c) est beaucoup plus fort avec ce régulateur. La différence entre les deux régulateurs transcriptionnels s'explique par le fait que pour hPPAR γ 2g2, le bruit de fond du système en absence de ligand
 25 est faible et reste faible, quelle que soit la quantité de régulateur présent. D'autre part, plus la quantité de hPPAR γ 2g2 augmente, plus l'activité induite est forte, ce qui n'est pas le cas du système utilisant hPPAR γ 2 qui semble saturer.

La présence d'un deuxième domaine de liaison au ligand (hPPAR γ 2g2) confère donc au régulateur transcriptionnel une plus grande inductibilité par le
 30 ligand.

EXEMPLE 6 : Augmentation de l'activité finale des promoteurs inductibles.

6.1. Construction d'une cassette d'expression inductible comprenant l'intron de hEF1a. Construction du plasmide Jx10AS-CMV-EF-pGL3.

Un fragment d'ADN, contenant le premier intron du gène codant pour hEF1a (de la position +16 à la position +984 par rapport au site d'initiation de la transcription ; numéro d'accès à Genbank : E02627), a été amplifié par ACP en utilisant les oligonucléotides 25RDA35 (5' AGT CAC TAG TAA GCT TTT TGC CGC CAG AAC ACA GG 3' ; SEQ ID NO: 14) et 26RDA36 (5' AGT CAC TAG TCC ATG GCT GCC CAG TGC CTC ACG ACC 3' ; SEQ ID NO: 15) comme amorces. Ce fragment a été digéré par HindIII et NcoI puis a été cloné dans le plasmide Jx10AS-CMV-pGL3 préalablement digéré par HindIII et NcoI pour obtenir le plasmide Jx10AS-CMV-EF-pGL3. Une représentation schématique du plasmide Jx10AS-CMV-EF-pGL3 est présentée dans la figure 14.

6.2. Activité du plasmide Jx10AS-CMV-EF-pGL3.

Dans le but d'augmenter l'activité finale du système, une séquence enhancer, située dans le premier intron du gène hEF1a, a été clonée au voisinage du promoteur inductible. Les résultats présentés dans la figure 15 montrent que la présence de la région enhancer augmente l'activité induite du système et ceci quelle que soit la quantité de régulateur transcriptionnel utilisée.

EXEMPLE 7 : Construction de plasmides comprenant à la fois une cassette d'expression du régulateur transcriptionnel et une cassette d'expression inductible.

7.1. Plasmide Jx5AS-TK-luc-hPPARg2.

Le plasmide pSG5-hPPARa(Koz) a été digéré par MluI et Scal pour isoler le fragment MluI-Scal de 1229 pb contenant la région 3' de l'ADN complémentaire de hPPARa. Ce fragment a été inséré dans le plasmide pSL301 préalablement digéré par MluI et SmaI pour donner le plasmide pSL-3'hPPARa.

5 Le plasmide pSG5-hPPARa(Koz) a été digéré par Sall et MluI pour isoler le fragment Sall-MluI de 1406 pb contenant le promoteur précoce du virus SV40 et la région 5' de l'ADN complémentaire de hPPARa. Ce fragment a été inséré dans le plasmide pSL-3'hPPARa préalablement digéré par XhoI et MluI pour donner le plasmide pSL-hPPARa.

10 Le plasmide pSL-hPPARa a été digéré par SpeI et Sall pour isoler le fragment SpeI-Sall de 2664 pb contenant le promoteur précoce du virus SV40 et l'ADN complémentaire de hPPARa. Ce fragment a été inséré dans le plasmide pBluescript II SK+ préalablement digéré par SpeI et Sall pour donner le plasmide pBS-hPPARa.

15 Le plasmide pSG5-hPPARg2 a été digéré par AvrII et SacI pour isoler le fragment AvrII-SacI de 2070 pb, noté C, contenant la région 5' de l'ADN complémentaire de hPPARg2. Un fragment d'ADN, noté D, contenant la région 3' de l'ADN complémentaire de hPPARg2, a été amplifié par ACP en utilisant le plasmide pSG5-hPPARg2 comme matrice et les oligonucléotides 10RDA21 (5'

20 CAG GTT TGC TGA ATG TGA AGC 3' ; SEQ ID NO: 16) et 11RDA40 (5' TGA CGT GTC GAC CTA GTA CAA GTC CTT GTA GAT CTC CTG C 3' ; SEQ ID NO: 17) comme amorces. Le fragment C et le fragment D, digéré par SacI et Sall, ont été clonés ensemble dans le plasmide pBS-hPPARa préalablement digéré par AvrII et Sall pour obtenir le plasmide pBS-hPPARg2.

25 Le plasmide Jx5AS-TK-pGL3 a été digéré par KpnI et Sall pour isoler le fragment KpnI-Sall de 2324 pb contenant le gène luc+ sous contrôle d'un promoteur inducible. Ce fragment a été inséré dans le plasmide pBS-hPPARg2 préalablement digéré par KpnI et Sall pour donner le plasmide Jx5AS-TK-luc-hPPARg2. Une représentation schématique du plasmide Jx5AS-TK-luc-hPPARg2

30 est présentée dans la figure 16.

7.2. Plasmide SV-g2-J10-C-pGL3.

5

Le plasmide pBS-hPPARg2 a été digéré par NotI et Sall pour isoler le fragment NotI-Sall de 2622 pb, noté E, contenant l'ADN complémentaire de hPPARg2 sous contrôle du promoteur précoce de SV40. Un fragment d'ADN, noté F, contenant le site de polyadénylation du virus SV40, a été amplifié par ACP en utilisant le plasmide FTK-pGL3 comme matrice et les oligonucléotides 18RDA31 (5' AGT CGT CGA CGC TTC GAG CAG ACA TGA TAA G 3' ; SEQ ID NO: 18) et 19RDA35 (5' AGT CGC TAG CGA CGG ATC CTT ATC GAT TTT ACC AC 3' ; SEQ ID NO: 19) comme amorces. Le fragment E et le fragment F, digéré par Sall et NheI, ont été clonés ensemble dans le plasmide Jx10AS-CMV-pGL3 préalablement digéré par NotI et NheI pour obtenir le plasmide SV-g2-J10-C-pGL3. Une représentation schématique du plasmide SV-g2-J10-C-pGL3 est présentée dans la figure 17.

10

15

7.3. Plasmide hPPARg2-CMV-Jx5AS-TK-pGL3.

20

Un fragment d'ADN, noté G, contenant l'ADN complémentaire de hPPARg2, a été amplifié par ACP en utilisant le plasmide Jx5AS-TK-luc-hPPARg2 comme matrice et les oligonucléotides 12RDA50 (5' GTC AGC TAG CCT ACT CGA GCC ACC ATG GGT GAA ACT CTG GGA GAT TCT CC 3' ; SEQ ID NO: 20) et 13RDA42 (5' TAC GGG GTA CCC AGA CAT GAT AAG ATA CAT TGA TGA GTT TGG 3' ; SEQ ID NO: 21) comme amorces. Un fragment d'ADN, noté H, contenant le promoteur minimum de hCMV-IE (de la position -54 à la position +48 par rapport au site d'initiation de la transcription), a été amplifié par ACP en utilisant le plasmide pCMVB3 comme matrice et les oligonucléotides 14RDA33 (5' GTC AGC TAG CCG GTA GGC GTG TAC GGT GGG AGG 3' ; SEQ ID NO: 22) et 15RDA33

25

30

(5' TAC GCT CGA GCT TCT ATG GAG GTC AAA ACA GCG 3' ; SEQ ID NO: 23) comme amorces. Le fragment G, digéré par KpnI et XhoI et le fragment H, digéré par XhoI et NheI ont été clonés ensemble dans le plasmide Jx5AS-TK-pGL3 préalablement digéré par KpnI et NheI pour obtenir le plasmide hPPARg2-CMV-Jx5AS-TK-pGL3. Une représentation schématique du plasmide hPPARg2-CMV-Jx5AS-TK-pGL3 est présentée dans la figure 18.

7.4. Plasmides hPPARg2-CMV-JxnAS-CMV-pGL3.

Le plasmide Jx5AS-CMV-pGL3 a été digéré par NheI et SphI pour isoler le fragment NheI-SphI de 982 pb contenant la région 5' du gène luc+ sous contrôle d'un promoteur inductible. Ce fragment a été inséré dans le plasmide hPPARg2-CMV-Jx5AS-TK-pGL3 préalablement digéré par SpeI et SphI pour donner le plasmide hPPARg2-CMV-Jx10AS-CMV-pGL3. Une représentation schématique du plasmide hPPARg2-CMV-Jx10AS-CMV-pGL3 est présentée dans la figure 19.

Le plasmide Jx5AS-CMV-pGL3 a été digéré par NheI et SphI pour isoler le fragment NheI-SphI de 982 pb contenant la région 5' du gène luc+ sous contrôle d'un promoteur inductible. Ce fragment a été inséré dans le plasmide hPPARg2-CMV-Jx10AS-CMV-pGL3 préalablement digéré par SpeI et SphI pour donner le plasmide hPPARg2-CMV-Jx15AS-CMV-pGL3.

Le plasmide Jx10AS-CMV-pGL3 a été digéré par NheI et SphI pour isoler le fragment NheI-SphI de 1151 pb contenant la région 5' du gène luc+ sous contrôle d'un promoteur inductible. Ce fragment a été inséré dans le plasmide hPPARg2-CMV-Jx10AS-CMV-pGL3 préalablement digéré par SpeI et SphI pour donner le plasmide hPPARg2-CMV-Jx20AS-CMV-pGL3.

EXEMPLE 8 : Comparaison de s différentes versions du système inductible in vitro.

La figure 20 rassemble les résultats obtenus in vitro avec plusieurs versions du système inductible. Ces résultats montrent que les systèmes utilisant deux plasmides (figure 20 lignes 1, 3 et 4) comme les systèmes à un seul plasmide (figure 20 lignes 2 et 5 à 9) sont fonctionnels ; c'est à dire que la présence d'un ligand de PPAR γ (ici le BRL49653) augmente fortement l'expression du gène placé sous le contrôle du promoteur inductible. On remarque également que pour certains systèmes (figure 20 lignes 3 et 7 à 9) le facteur d'induction par le ligand est supérieur à 30, et que pour le système présenté sur la figure 20 ligne 4, l'activité après induction est égale à celle d'un promoteur fort comme celle du promoteur hCMV-IE.

EXEMPLE 9 : Différents ligands des PPAR peuvent activer le système inductible.

9.1. Système utilisant hPPAR γ 2.

Les résultats présentés dans la figure 21 montrent que des ligands de hPPAR γ autres que le BRL49653, ici le RG12525 (ligand RPR de hPPAR γ), peuvent être utilisés pour activer le système inductible. A une concentration de 100 μ M, un traitement avec le RG12525 conduit même à une induction plus forte que celle obtenue avec le BRL49653. Tout autre ligand de PPAR γ peut donc être utilisé comme inducteur du système.

9.2. Système utilisant hPPAR α .

De la même manière que pour le système utilisant hPPARg, un système utilisant hPPARa comme régulateur transcriptionnel peut être activé avec les fibrates ou le WY-14,643 par exemple ou tout autre ligand de hPPARa.

5

EXEMPLE 10 : Le système inductible peut être activé in vivo, dans le muscle .

La figure 22 rassemble les résultats obtenus in vivo, dans le muscle, avec différentes versions du système inductible. Les résultats montrent que pour les
10 trois versions testées (figure 22 lignes 2 à 4), un traitement par gavage avec un ligand de hPPARg est capable d'augmenter fortement, dans le muscle, l'activité des promoteurs inductibles. Les facteurs d'induction sont : x14 pour la version figure 22 ligne 2, x8 pour la version figure 22 ligne 3, et x24 pour la version figure 22 ligne 4. De plus, pour l'une des versions (figure 22 ligne 2), l'activité obtenue
15 chez les animaux traités au BRL49653 est de l'ordre de celle d'un promoteur fort comme le promoteur hCMV-IE.

Les résultats, présentés dans la figure 23, montrent également qu'une seule prise de ligand peut induire le système, que cette prise ait lieu avant ou après le transfert de gène. Cette expérience montre aussi qu'une dose deux fois moins
20 importante que celle utilisée habituellement, permet d'obtenir le même facteur d'induction.

Le système, utilisant un récepteur nucléaire PPAR comme régulateur transcriptionnel, est donc fonctionnel in vivo et peut être induit par la prise orale d'un ligand des PPAR.

25

REVENDEICATIONS

1. Composition comprenant :
 - (a) un premier élément comprenant un acide nucléique d'intérêt sous contrôle d'un promoteur inductible comprenant un élément de réponse à un PPAR et un promoteur transcriptionnel minimal, et
 - (b) un deuxième élément comprenant un acide nucléique codant un PPAR sous contrôle d'un promoteur transcriptionnel, en vue de leur utilisation simultanée, séparée ou espacée dans le temps.
2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre:
 - (c) un ligand de PPAR. en vue d'une utilisation simultanée, séparée ou espacée dans le temps.
3. Composition selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que les éléments (a) et (b) sont portés par des constructions génétiques distinctes.
4. Composition selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que les éléments (a) et (b) sont assemblés dans une même construction génétique.
5. Composition selon la revendication 3 ou 4, caractérisée en ce que la construction génétique est un vecteur plasmidique ou viral.
6. Composition selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'élément de réponse à un PPAR comprend un ou plusieurs sites de liaison du PPAR.

7. Composition selon la revendication 6, caractérisée en ce que l'élément de réponse à un PPAR comprend un ou plusieurs sites de séquence SEQ ID NO:1 ou de variants fonctionnels de cette séquence.

5 8. Composition selon la revendication 6, caractérisée en ce que l'élément de réponse à un PPAR comprend un ou plusieurs sites de séquence SEQ ID NO: 5 ou de variants fonctionnels de cette séquence.

10 9. Composition selon les revendications 6 à 8, caractérisée en ce que l'élément de réponse comprend jusqu'à 30 sites de liaison, de préférence de 3 à 20, plus préférentiellement de 5 à 15.

15 10. Composition selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que le promoteur minimal est un promoteur d'un gène cellulaire ou viral délété de région(s) non essentielle(s) à l'activité transcriptionnelle.

11. Composition selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que le promoteur inductible comprend en outre une région enhanceur.

20 12. Composition selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que le promoteur minimal et l'élément de réponse à un PPAR sont dans la même orientation.

25 13. Composition selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que le promoteur minimal et l'élément de réponse à un PPAR sont en orientation inverse.

14. Composition selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que l'acide nucléique codant un PPAR code un PPARGa ou un PPARGg.

15. Composition selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisée en ce que l'acide nucléique codant un PPAR code un PPAR modifié comprenant plusieurs sites de liaison au ligand.
- 5 16. Composition selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un élément (d) comprenant un acide nucléique codant un RXR sous contrôle d'un promoteur transcriptionnel.
- 10 17. Vecteur comprenant un élément (a) et un élément (b) selon la revendication 1.
18. Vecteur selon la revendication 17, caractérisé en ce que les éléments (a) et (b) sont en orientation opposée.
- 15 19. Vecteur selon la revendication 17 ou 18, caractérisé en ce que le promoteur inductible de l'élément (a) et le promoteur transcriptionnel de l'élément (b) sont assemblés dans le vecteur pour former un promoteur bidirectionnel régula- ble.
- 20 20. Vecteur selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comprend, dans le sens 5'→3', un premier acide nucléique codant un PPAR, un premier promoteur transcriptionnel minimal contrôlant l'expression dudit premier acide nucléique, un ou plusieurs éléments de réponse à un PPAR, un deuxième promoteur transcriptionnel minimal et, sous le contrôle dudit deuxième promoteur transcriptionnel minimal, un deuxième acide nucléique codant un produit d'intérêt.
- 25 21. Vecteur selon l'une des revendications 17 à 20 caractérisé en ce qu'il comprend en outre un élément (d) selon la revendication 16.

22. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 16 ou d'un vecteur selon l'une des revendications 17 à 21 pour exprimer un acide nucléique d'intérêt dans une cellule ex vivo ou in vitro.

5 23. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 16 ou d'un vecteur selon l'une des revendications 17 à 21 pour la préparation d'un produit destiné à exprimer un acide nucléique d'intérêt dans une cellule in vivo.

10 24. Procédé pour l'expression régulée d'un acide nucléique dans une cellule, in vitro ou ex vivo comprenant la mise en contact de ladite cellule avec une composition selon l'une des revendications 1 à 16 ou un vecteur selon l'une des revendications 17 à 21.

15 25. Procédé selon la revendication 24, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une cellule mammifère, de préférence humaine.

26. Procédé selon la revendication 25, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une cellule musculaire.

20 27. Cellule modifiée par mise en contact avec une composition selon l'une des revendications 1 à 16 ou un vecteur selon l'une des revendications 17 à 21.

28. PPAR modifié comprenant plusieurs sites de liaison au ligand.

25 29. Acide nucléique codant pour un PPAR selon la revendication 28.

30 30. Procédé d'identification de ligands des PPAR, comprenant la mise en contact d'une cellule selon la revendication 27 avec une molécule test et la mise en évidence d'une expression de l'acide nucléique d'intérêt.

ORIGINAL

nucléotides peuvent être des résidus neutres sur le plan fonctionnel, résultant par exemple d'étapes de clonage (extrémités PCR, sites de restriction, etc.). Ces nucléotides peuvent aussi posséder des propriétés biologiques, permettant de conférer des caractéristiques ou performances améliorées au système de l'invention

5 (amplificateur de gènes de ménage, amplificateur tissus spécifiques, silenceur, intron, site d'épissage, etc.). A cet égard, dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le promoteur inductible comprend en outre une région amplificatrice. Une telle région permet avantageusement d'augmenter les niveaux d'expression de l'acide nucléique d'intérêt. Une telle région amplificatrice (E) est préférentiellement

10 positionnée en 3' du promoteur minimal, entre ce dernier et l'acide nucléique d'intérêt, selon le schéma suivant (5'→3'): PPRE-Pmin-E-AN.

D'autre part, dans les constructions de l'invention, le promoteur minimal et l'élément de réponse à un PPAR peuvent être présents soit dans la même orientation (c'est-à-dire dans le sens de la transcription), soit en orientation inverse (c'est-à-dire

15 que l'élément de réponse à un PPAR est dans l'orientation antisens par rapport à la transcription par le promoteur Pmin). Comme illustré dans les exemples, ces deux modes de réalisation permettent un contrôle efficace de la régulation de l'expression in vitro comme in vivo.

20 Comme indiqué ci-avant, l'élément (b) des compositions selon l'invention comprend au moins:

- un acide nucléique codant un PPAR,
- sous contrôle d'un second promoteur transcriptionnel.

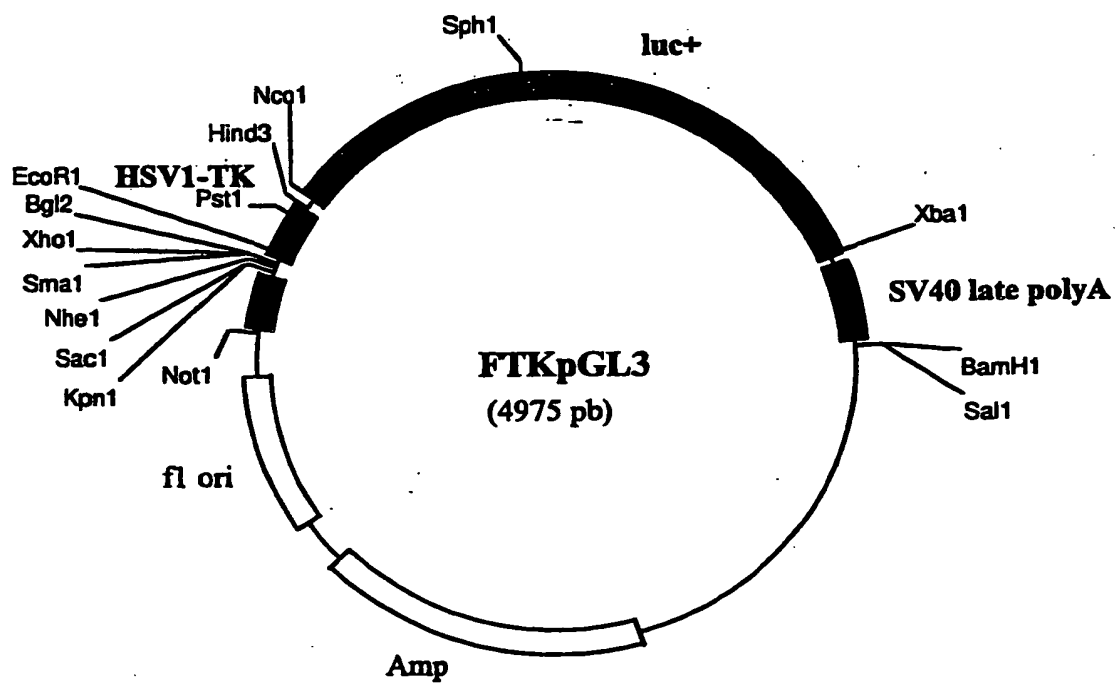
Les PPAR appartiennent à la superfamille des récepteurs hormonaux

25 nucléaires, et sont regroupés dans trois groupes distincts, les PPAR α , PPAR δ (également appelé NUC-1 ou PPAR β) et PPAR γ . L'isolement et la séquence de nombreux PPAR humains ont été décrits dans la littérature (voir notamment Sher T. et coll., *Biochemistry*, **32** (1993) 5598-5604 ; Mukherjee R. et coll., *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **51** (1994) 157-166 ; Fajas L. et coll., *J. Biol. Chem.*, **272**

30 (1997) 18779-18789 ; Mukherjee R. et coll., *J. Biol. Chem.*, **272** (1997) 8071-8076;

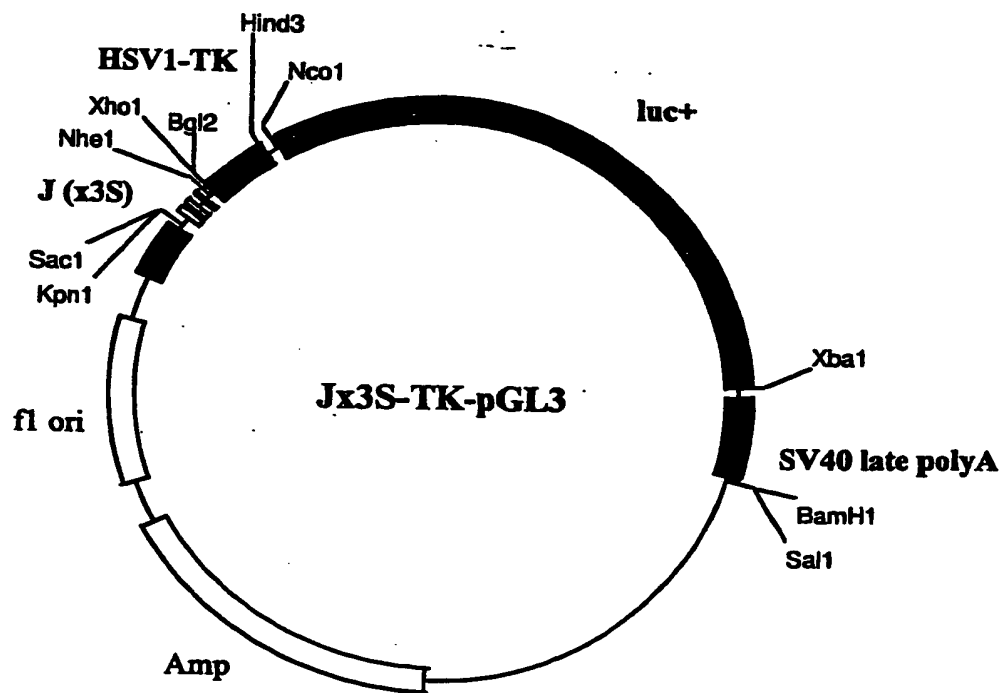
7. Composition selon la revendication 6, caractérisée en ce que l'élément de réponse à un PPAR comprend un ou plusieurs sites de séquence SEQ ID NO:1 ou de variants fonctionnels de cette séquence.
- 5 8. Composition selon la revendication 6, caractérisée en ce que l'élément de réponse à un PPAR comprend un ou plusieurs sites de séquence SEQ ID NO: 5 ou de variants fonctionnels de cette séquence.
9. Composition selon les revendications 6 à 8, caractérisée en ce que l'élément de
10 réponse comprend jusqu'à 30 sites de liaison, de préférence de 3 à 20, plus préférentiellement de 5 à 15.
10. Composition selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que le promoteur minimal est un promoteur d'un gène cellulaire ou viral délété de
15 région(s) non essentielle(s) à l'activité transcriptionnelle.
11. Composition selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que le promoteur inductible comprend en outre une région amplificatrice.
- 20 12. Composition selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que le promoteur minimal et l'élément de réponse à un PPAR sont dans la même orientation.
13. Composition selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que le
25 promoteur minimal et l'élément de réponse à un PPAR sont en orientation inverse.
14. Composition selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que l'acide nucléique codant un PPAR code un PPAR α ou un PPAR δ .

7. Composition selon la revendication 6, caractérisée en ce que l'élément de réponse à un PPAR comprend un ou plusieurs sites de séquence SEQ ID NO:1 ou de variants fonctionnels de cette séquence.
- 5 8. Composition selon la revendication 6, caractérisée en ce que l'élément de réponse à un PPAR comprend un ou plusieurs sites de séquence SEQ ID NO: 5 ou de variants fonctionnels de cette séquence.
- 10 9. Composition selon les revendications 6 à 8, caractérisée en ce que l'élément de réponse comprend jusqu'à 30 sites de liaison, de préférence de 3 à 20, plus préférentiellement de 5 à 15.
- 15 10. Composition selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que le promoteur minimal est un promoteur d'un gène cellulaire ou viral délété de région(s) non essentielle(s) à l'activité transcriptionnelle.
11. Composition selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que le promoteur inductible comprend en outre une région amplificatrice.
- 20 12. Composition selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que le promoteur minimal et l'élément de réponse à un PPAR sont dans la même orientation.
- 25 13. Composition selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que le promoteur minimal et l'élément de réponse à un PPAR sont en orientation inverse.
14. Composition selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que l'acide nucléique codant un PPAR code un PPAR α ou un PPAR γ .



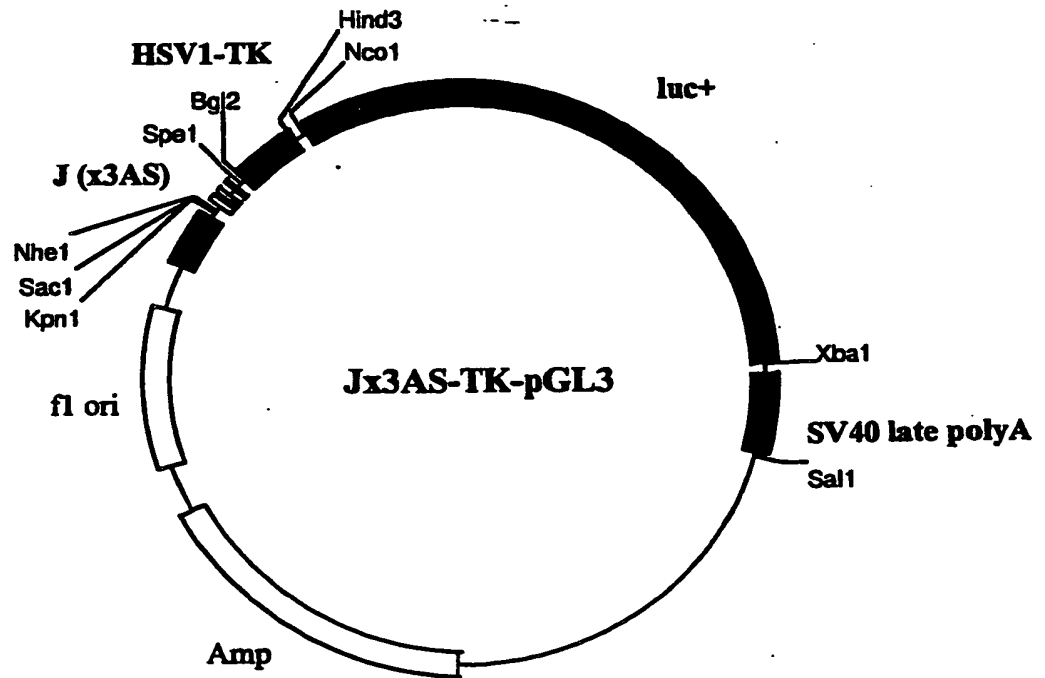
ORIGINAL

FIGURE 1



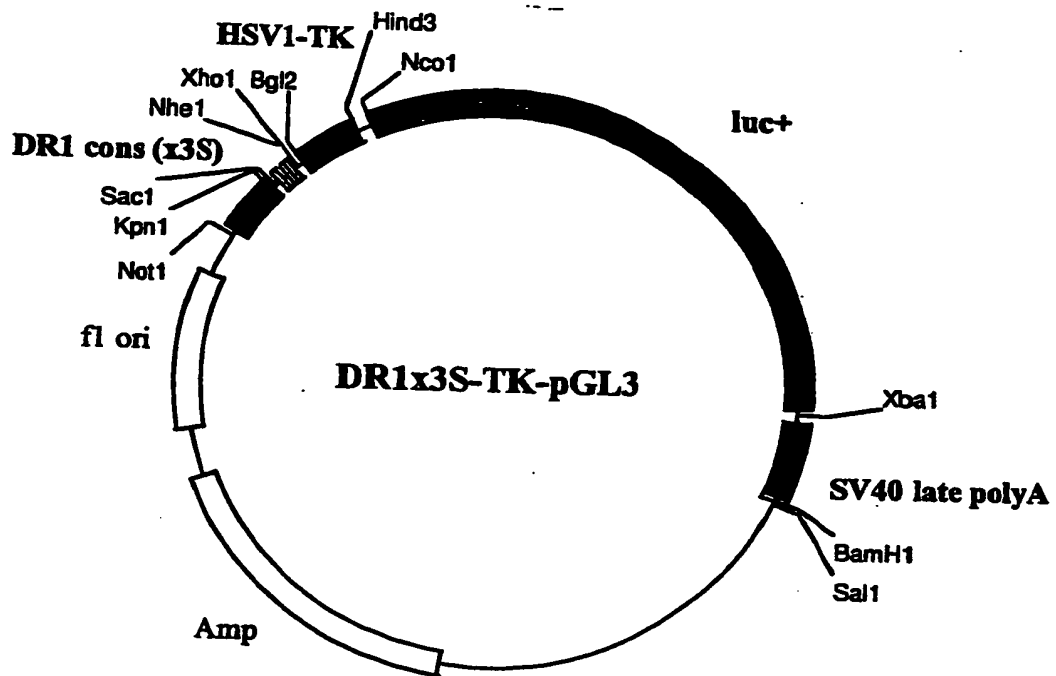
ORIGINAL

FIGURE 2



ORIGINAL

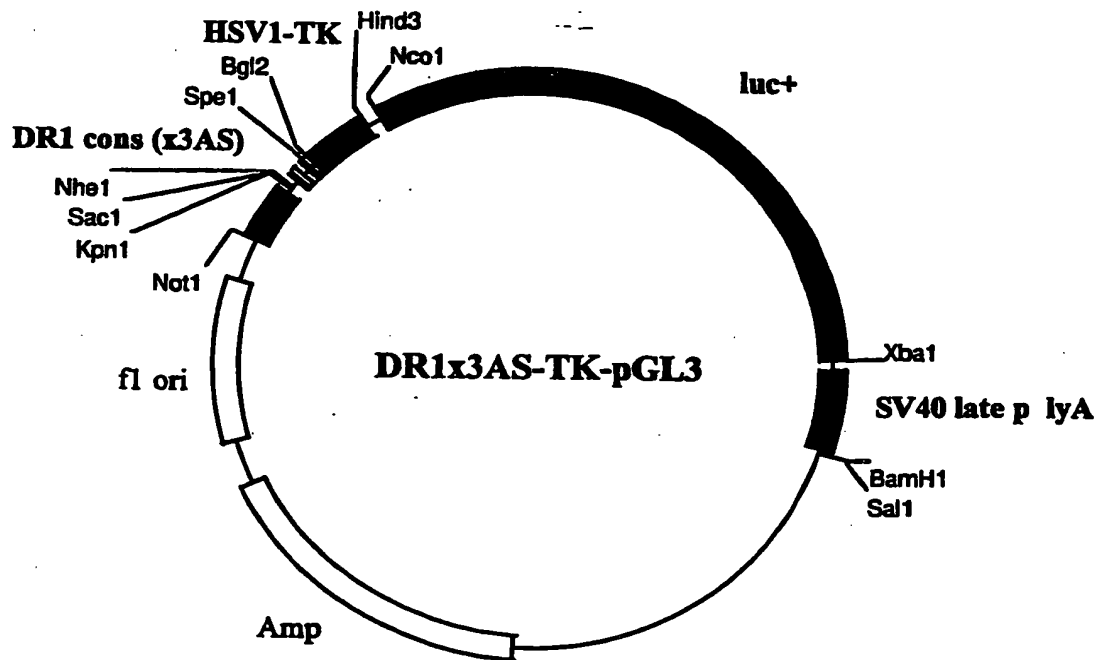
FIGURE 3



ORIGINAL

FIGURE 4

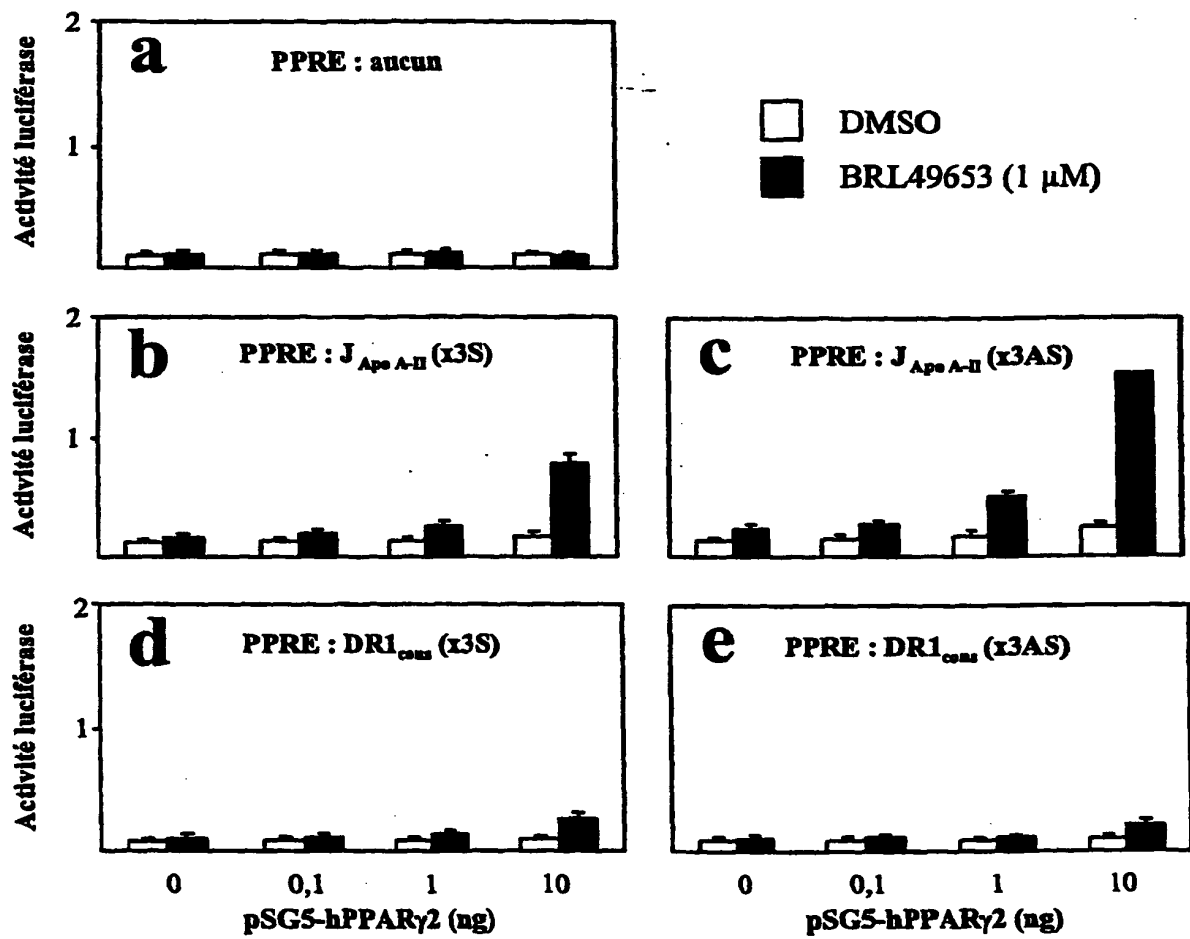
5/23



ORIGINAL

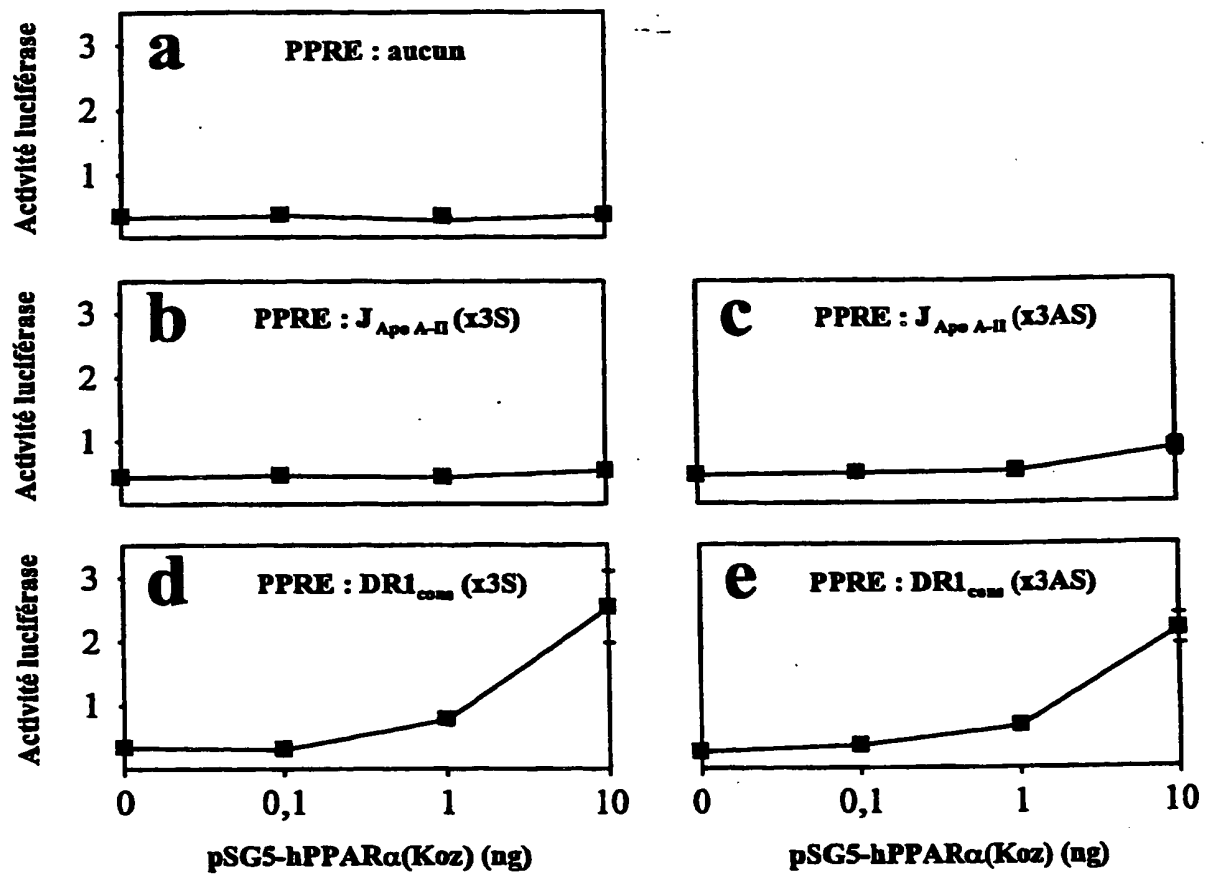
FIGURE 5

6/23



ORIGINAL

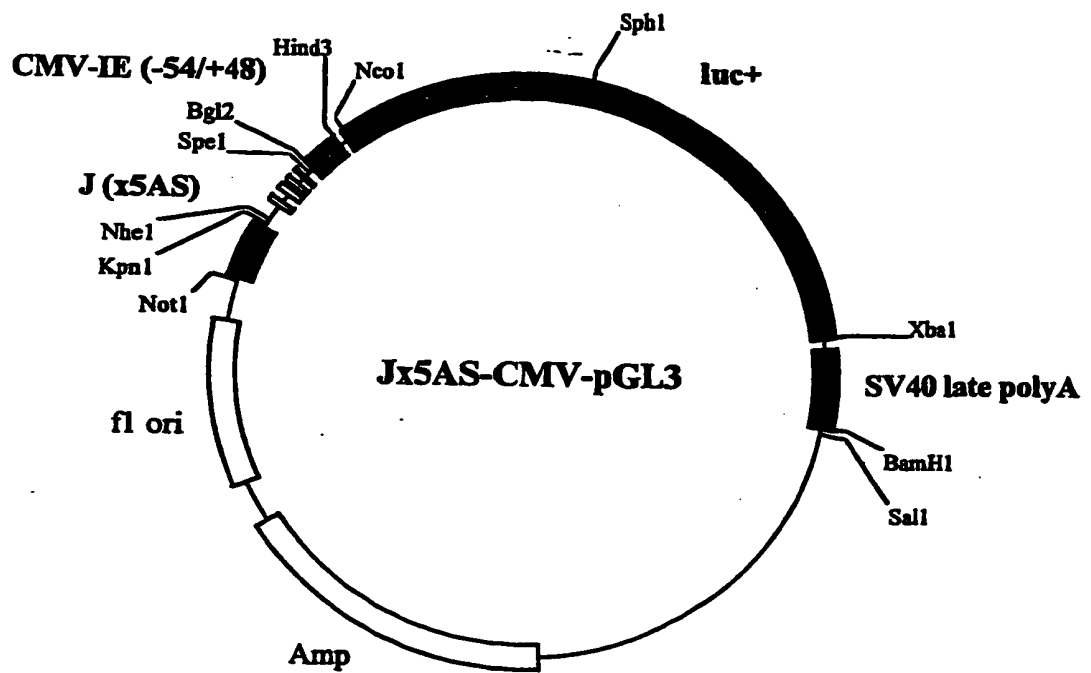
FIGURE 6



ORIGINAL

FIGURE 7

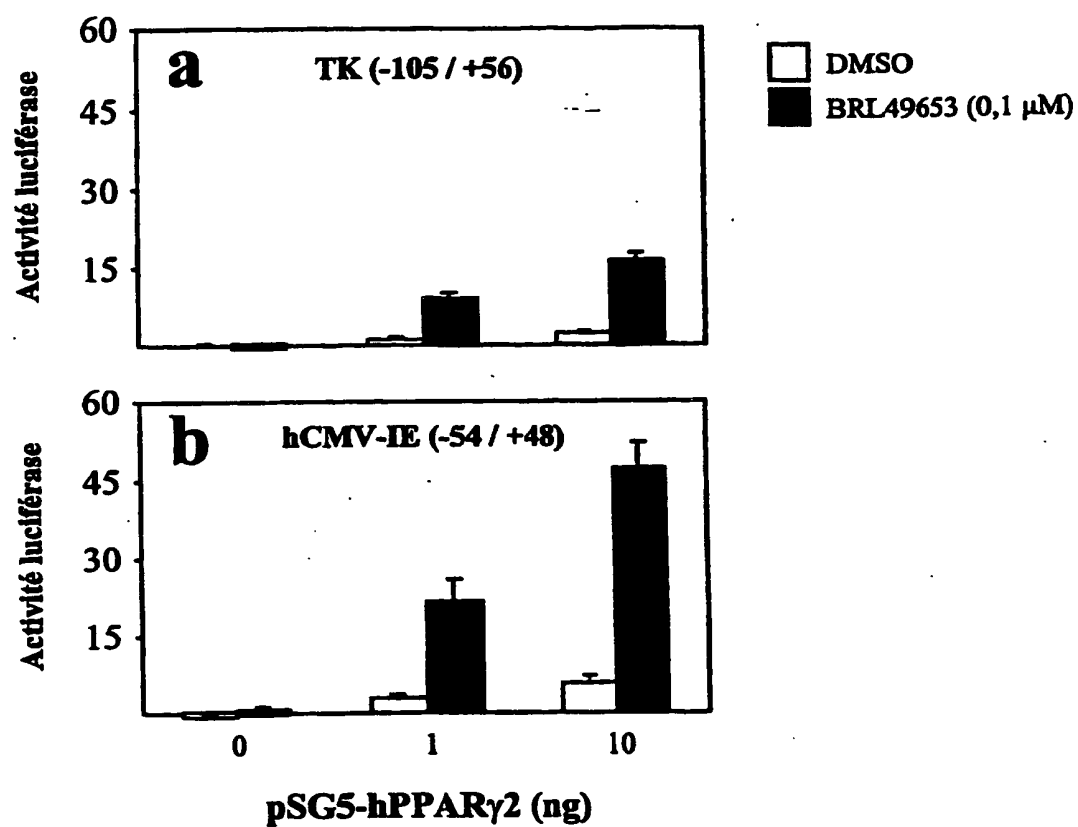
8/23



ORIGINAL

FIGURE 8

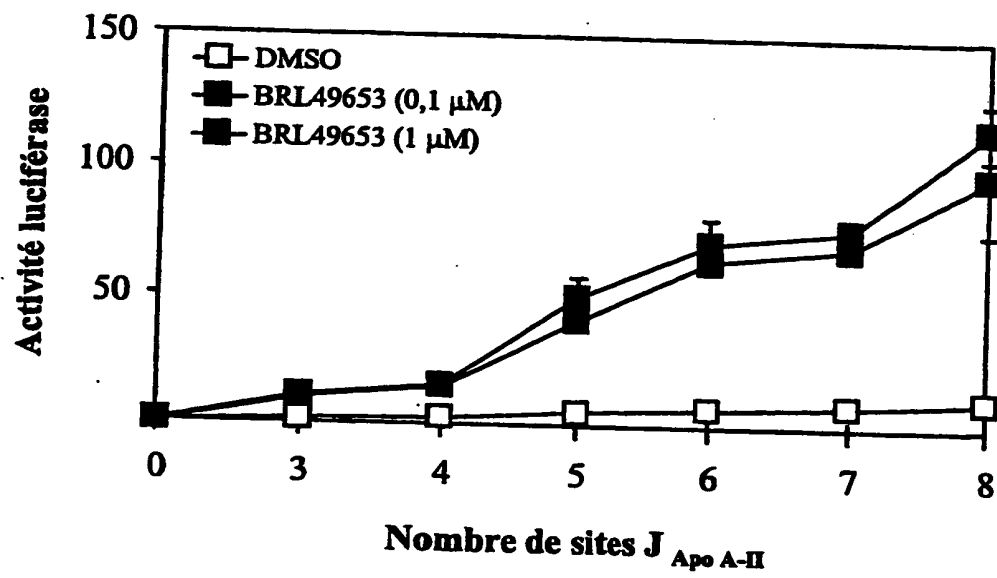
9/23



ORIGINAL

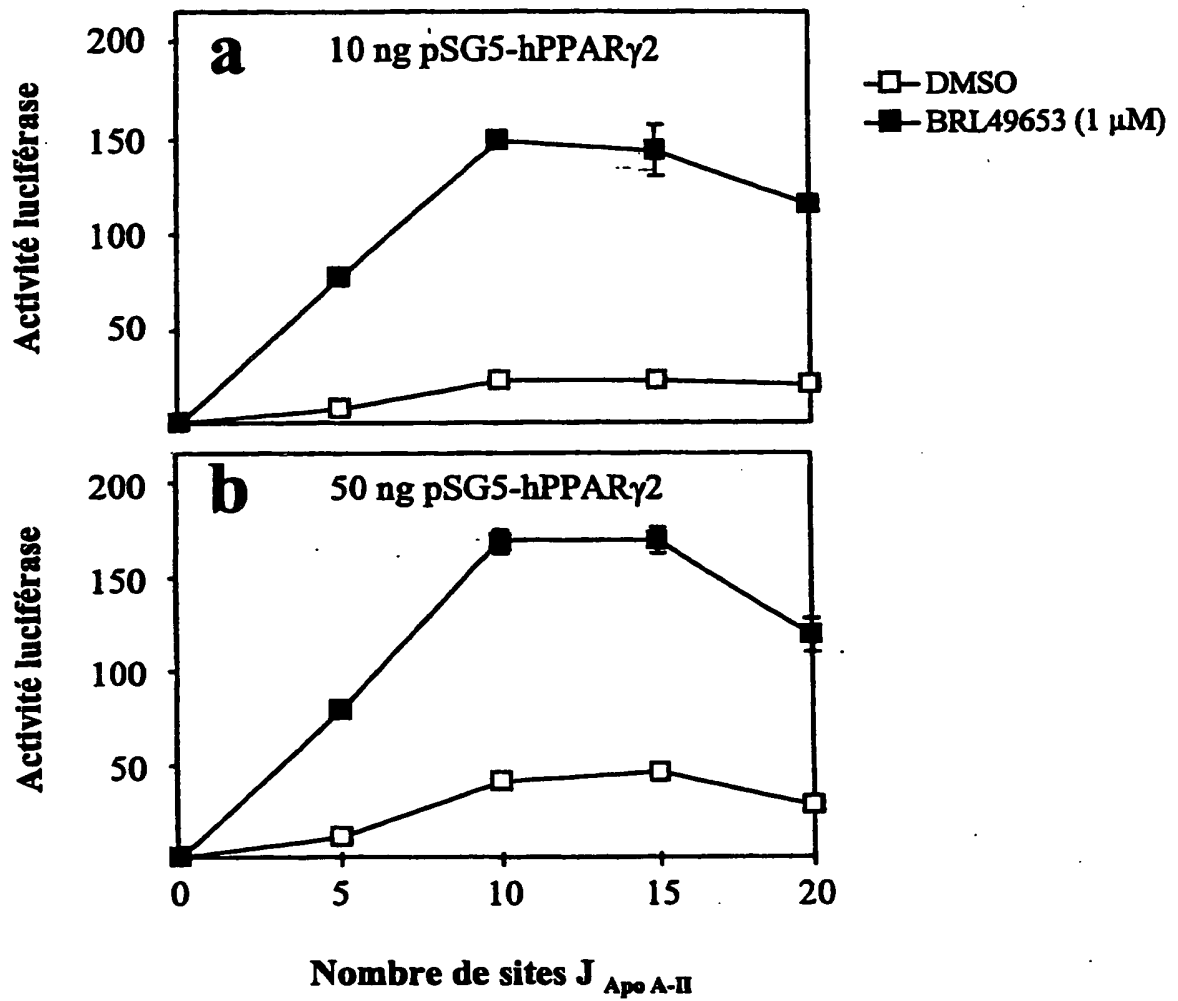
FIGURE 9

10/23



ORIGINAL

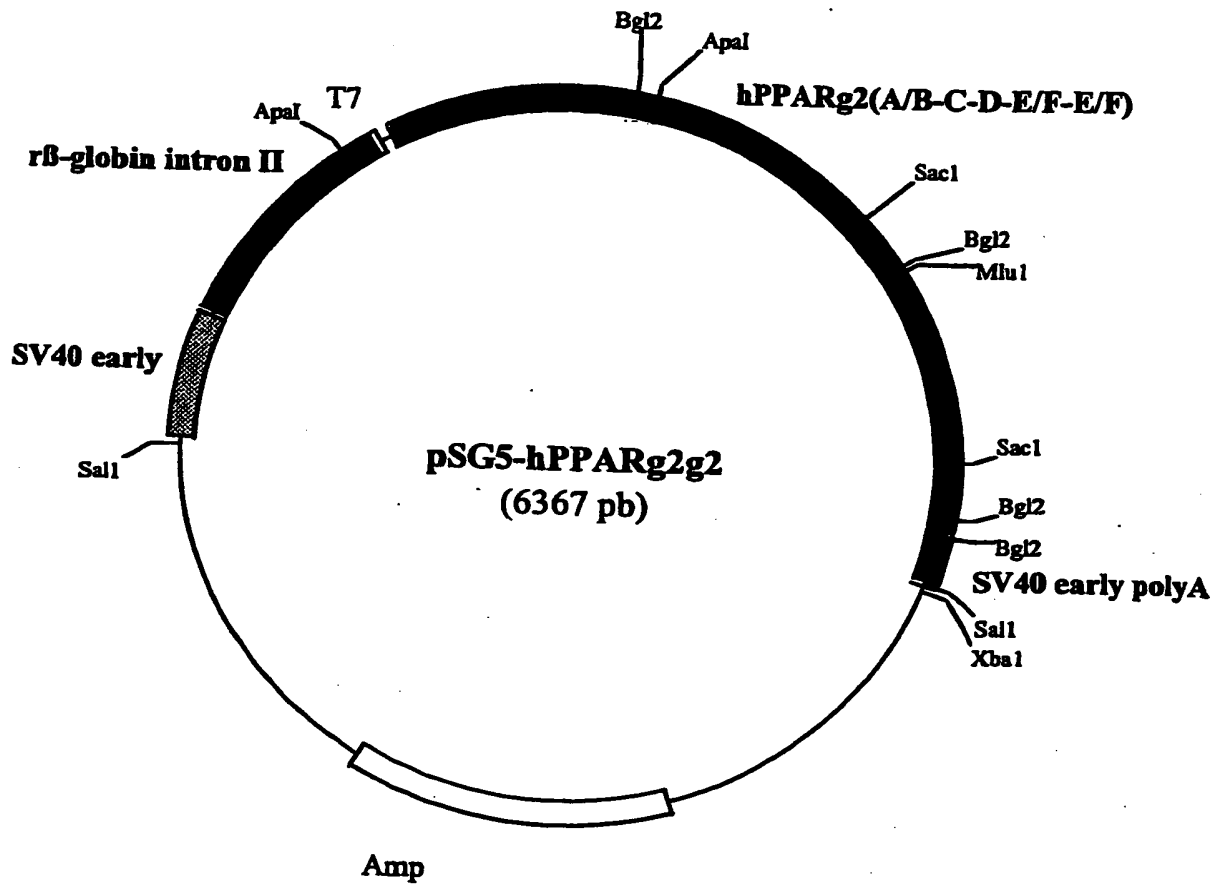
FIGURE 10



ORIGINAL

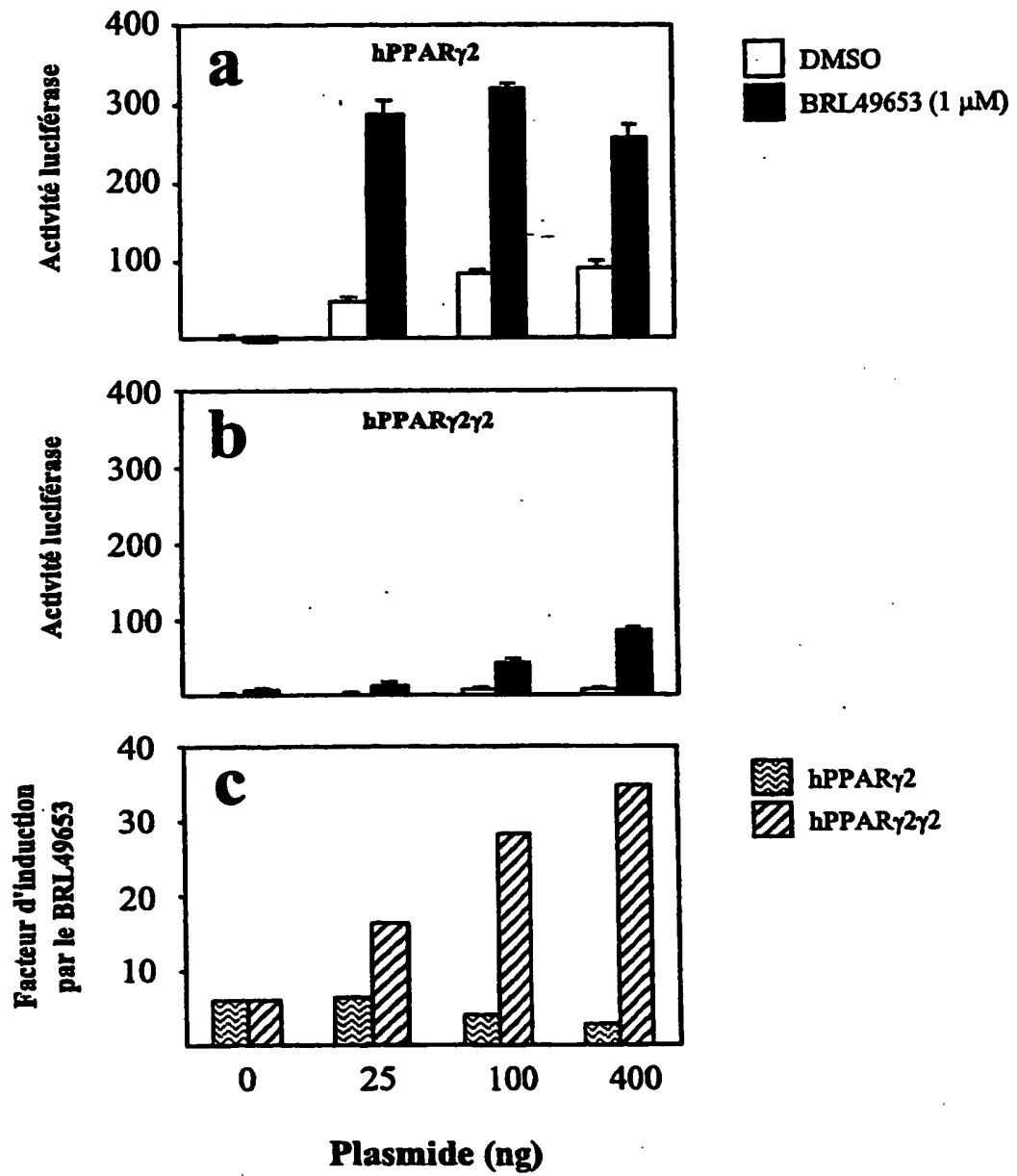
FIGURE 11

12/23



ORIGINAL

FIGURE 12



ORIGINAL

FIGURE 13

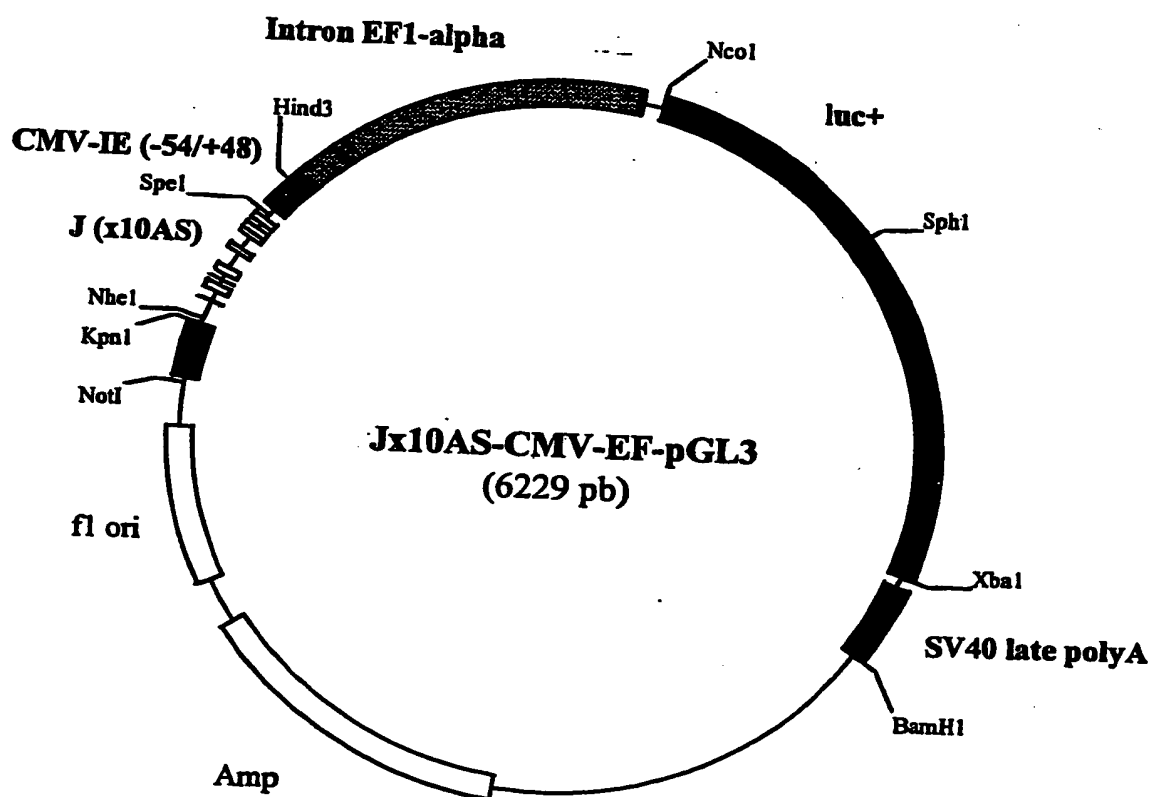


FIGURE 14

ORIGINAL

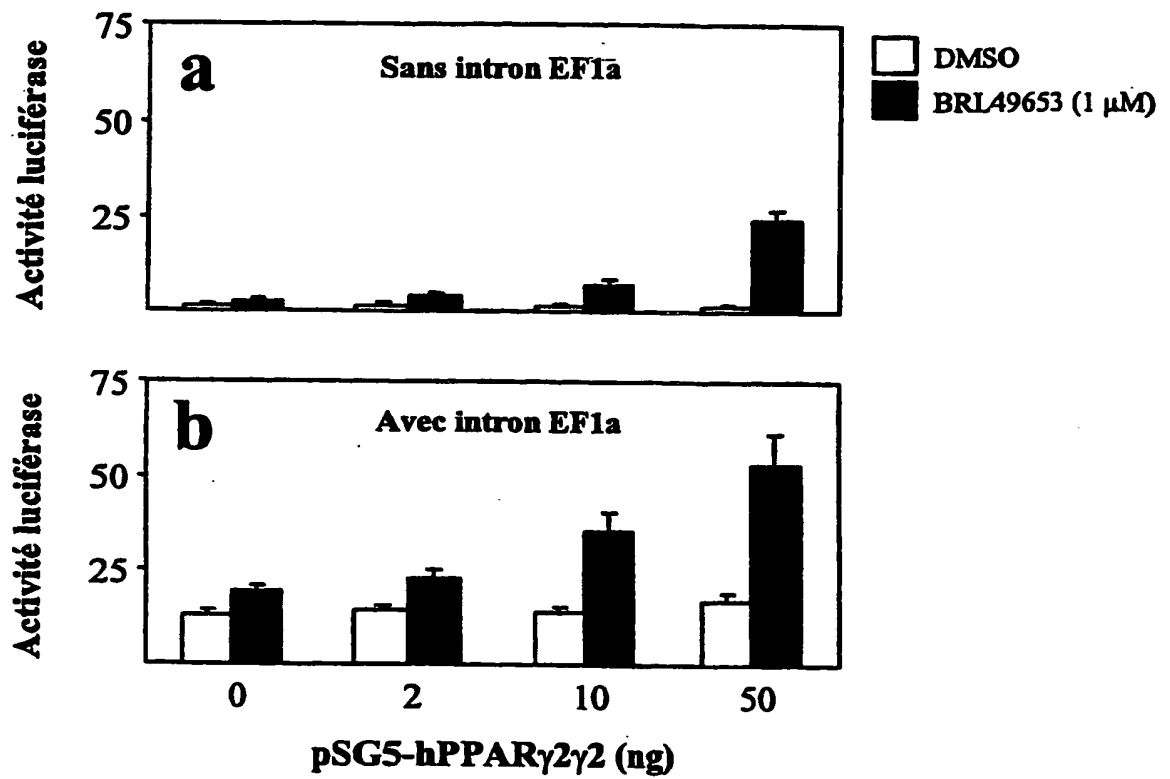


FIGURE 15

ORIGINAL

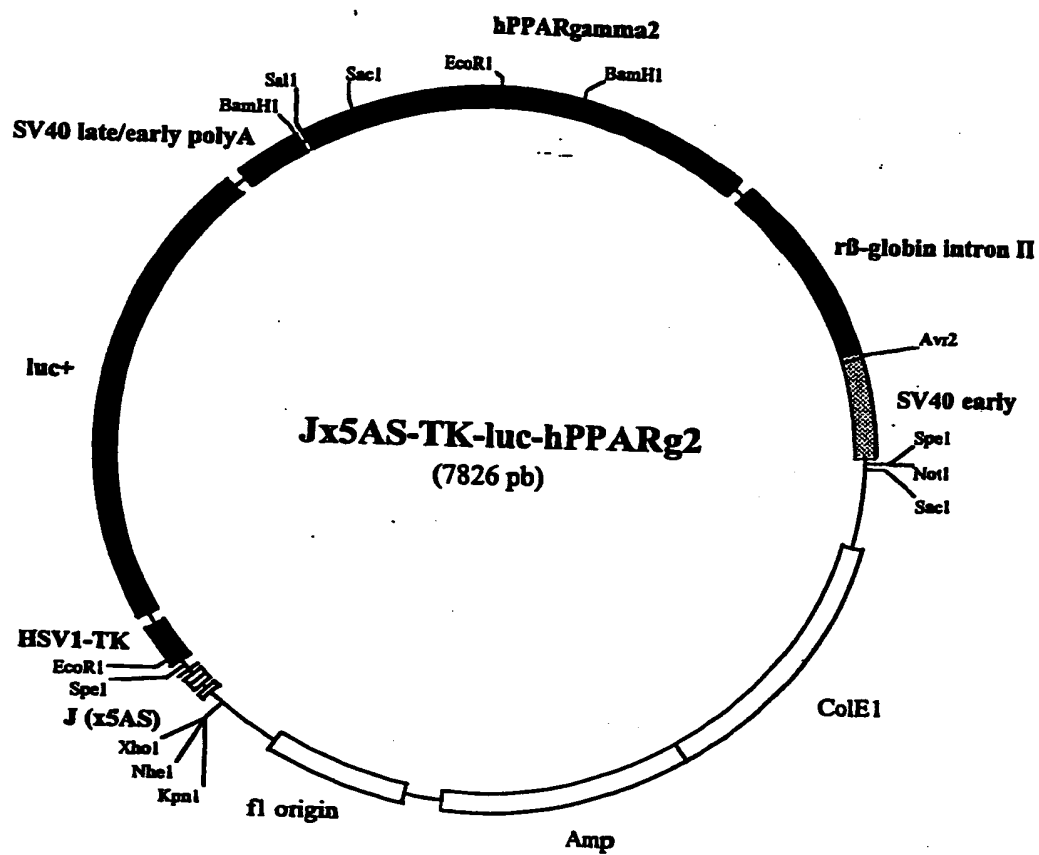
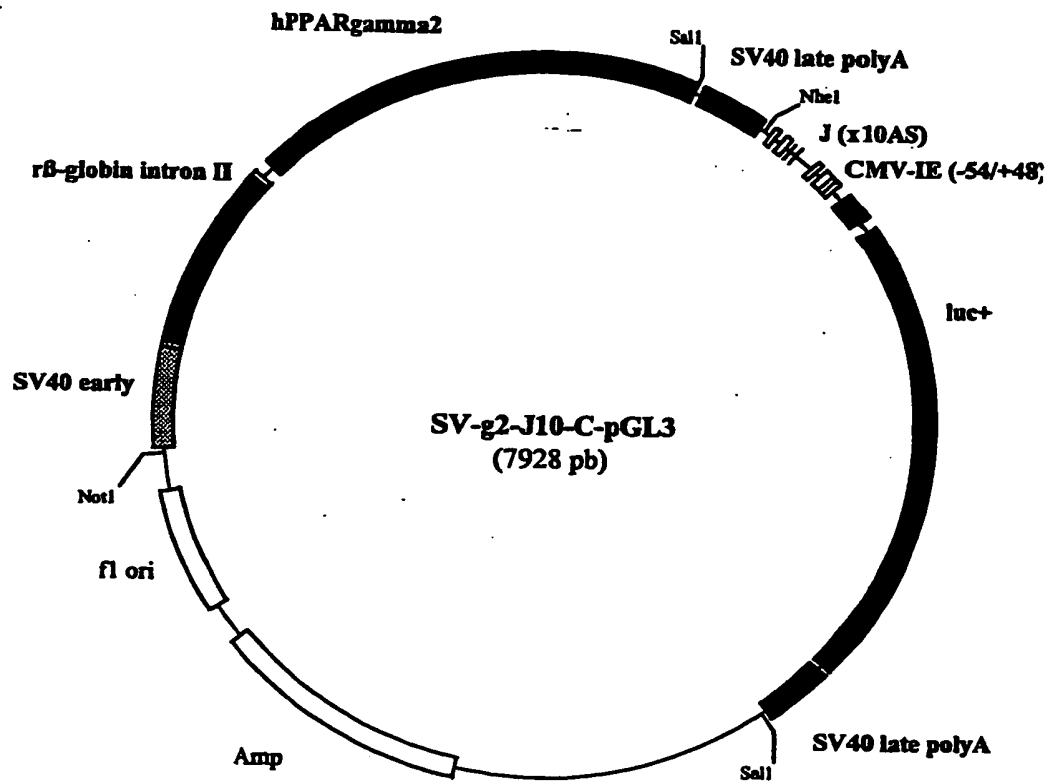


FIGURE 16

ORIGINAL



ORIGINAL

FIGURE 17

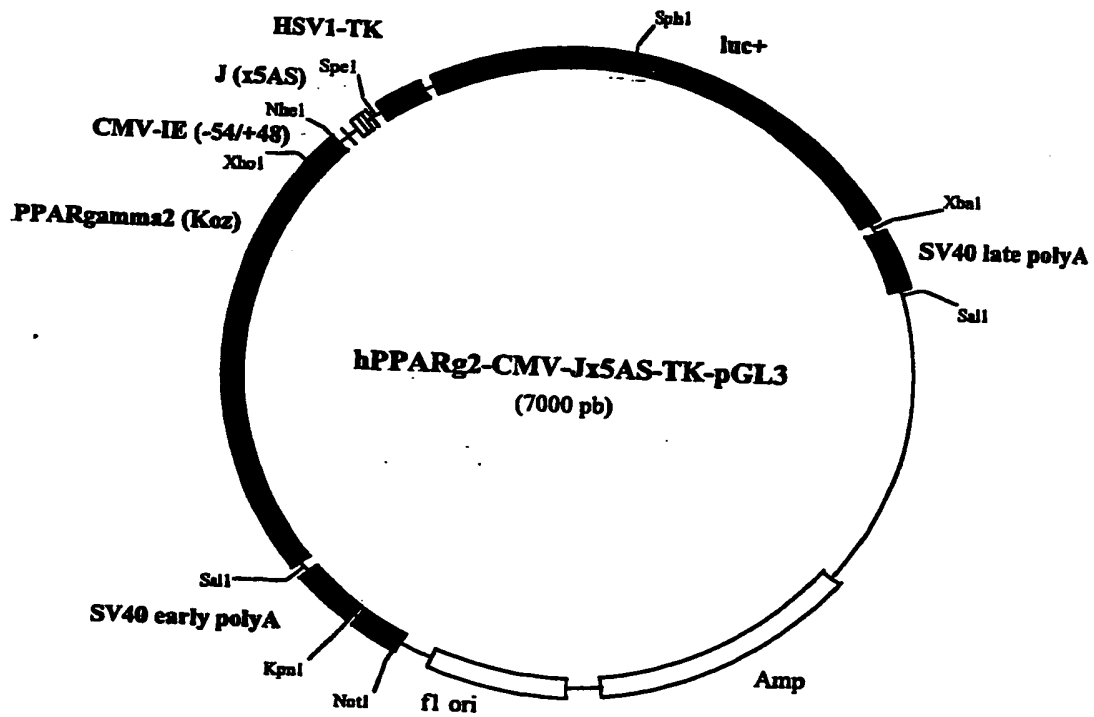
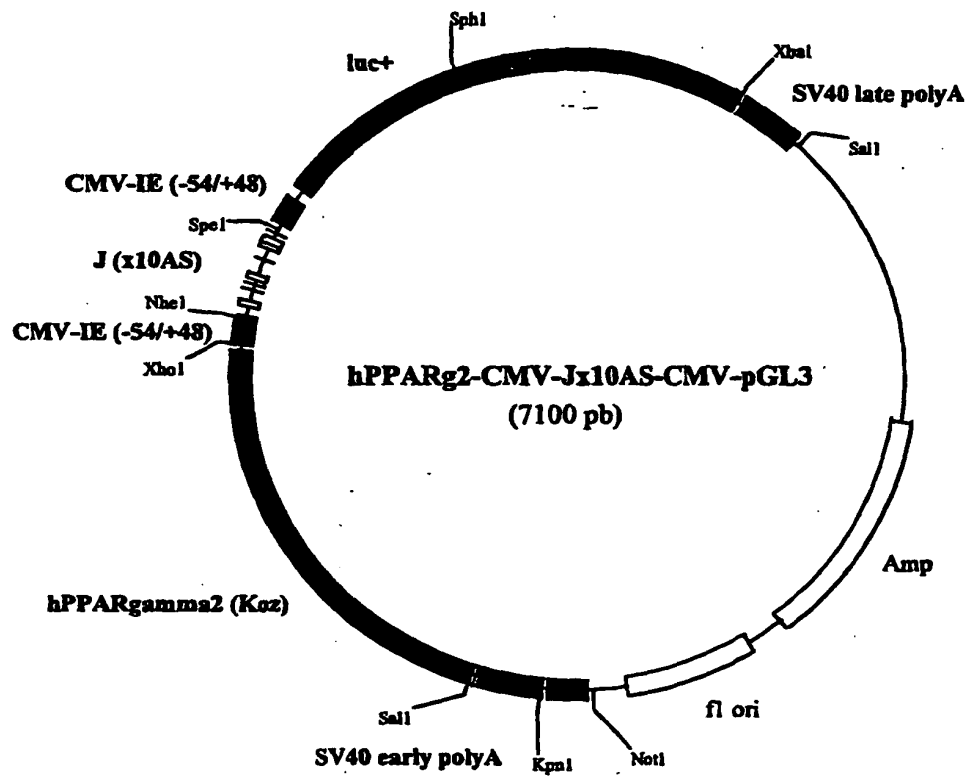


FIGURE 18

ORIGINAL



ORIGINAL

FIGURE 19

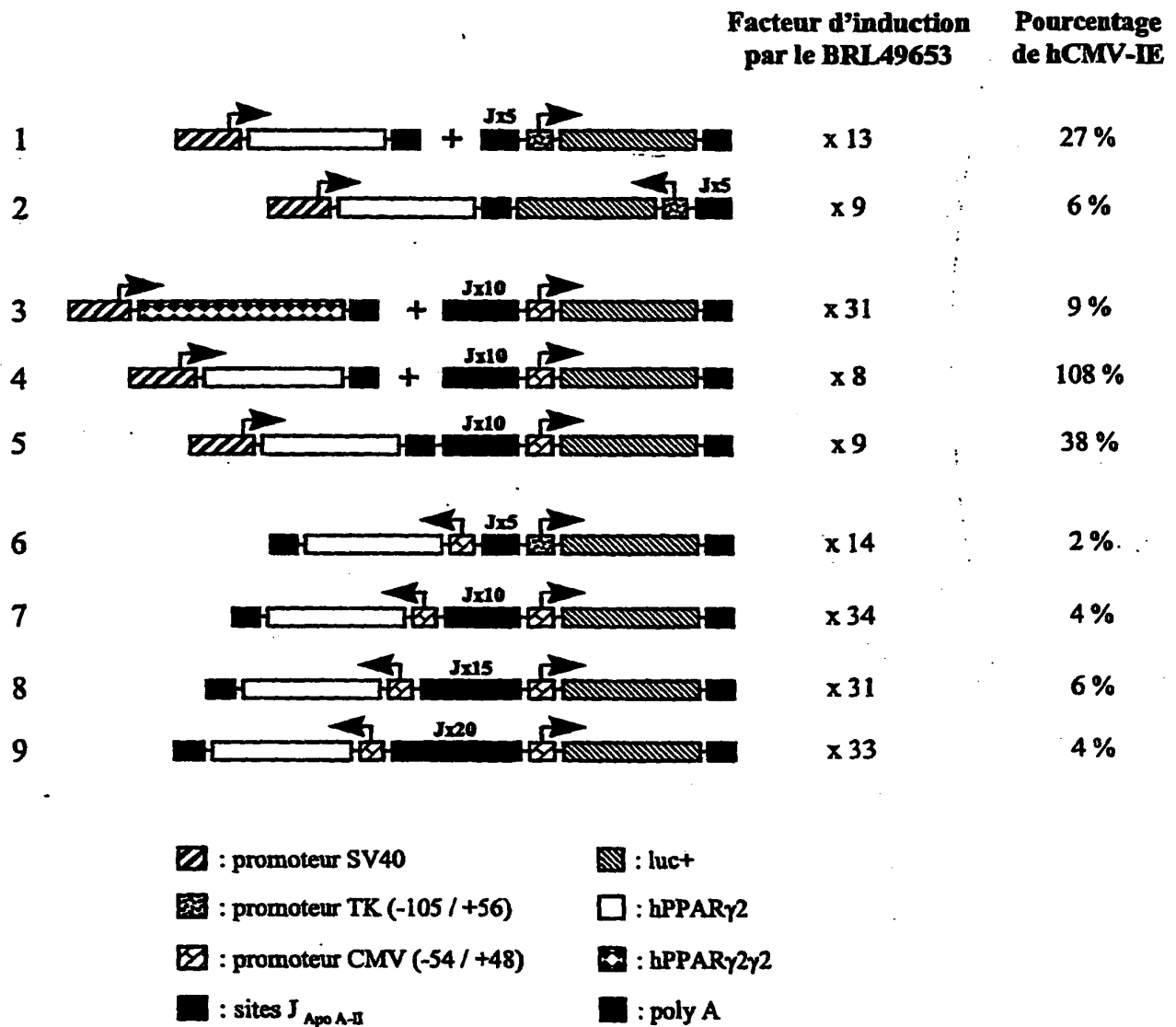


FIGURE 20

ORIGINAL

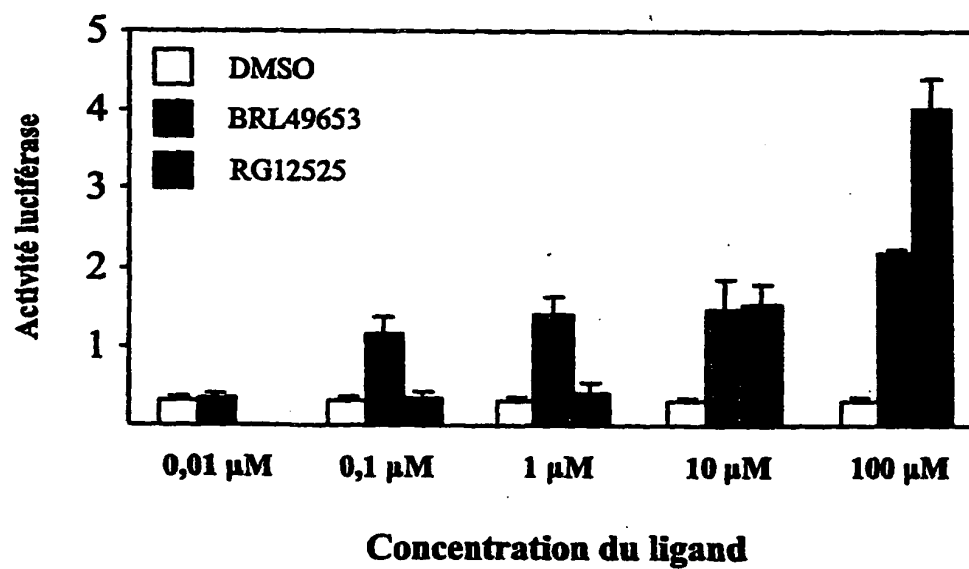
a**b**

FIGURE 21

ORIGINAL

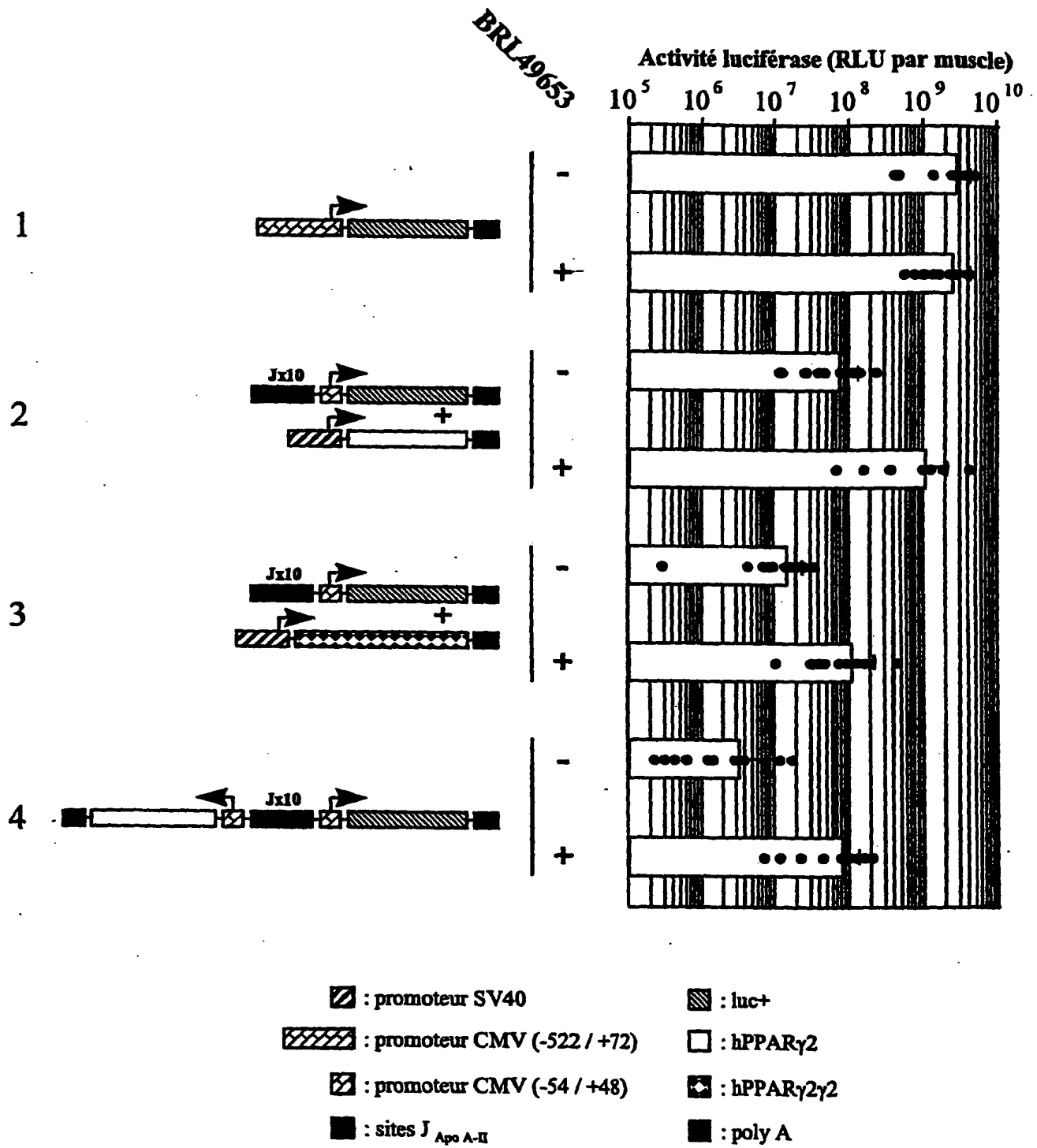
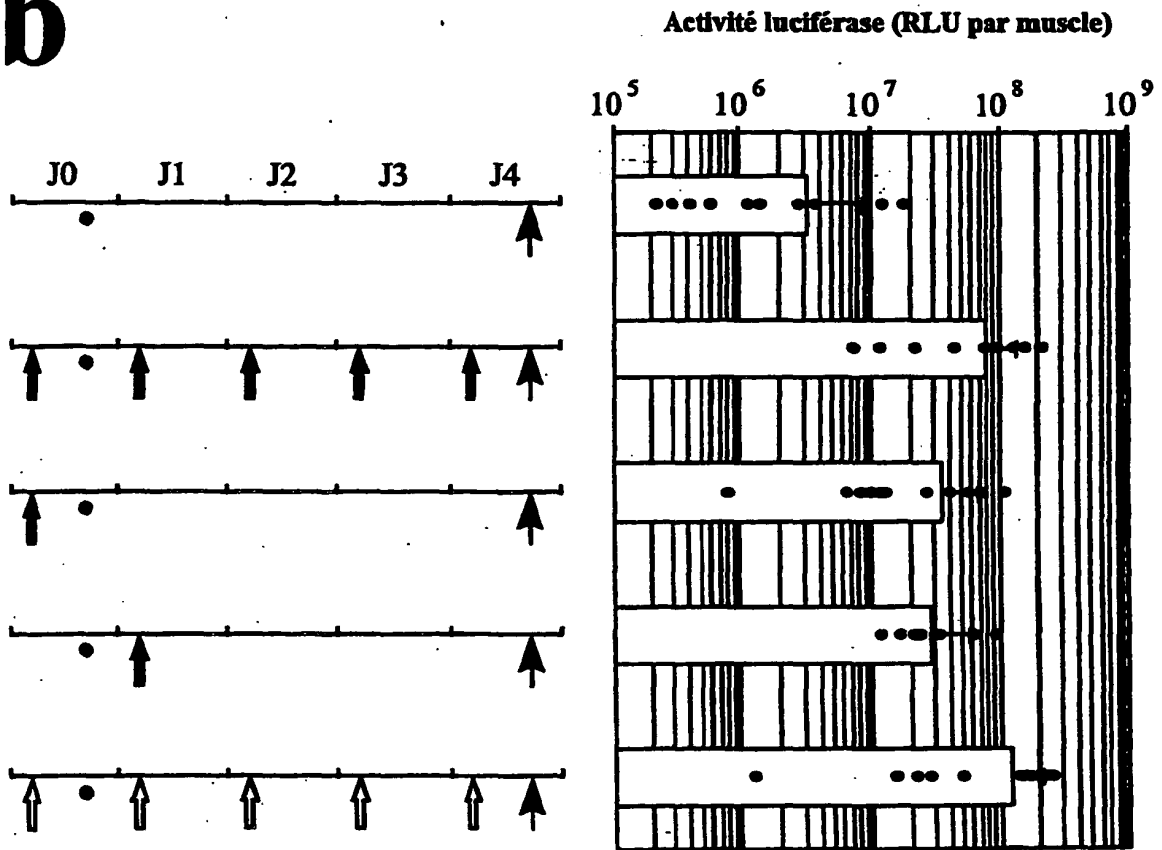


FIGURE 22

ORIGINAL

a**b**

↑ : prise de BRL49653 (30 mg/kg)

↑ : prise de BRL49653 (15 mg/kg)

● : injection du plasmide et électrotransfert

↑ : sacrifice des animaux

FIGURE 23

ORIGINAL

